



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN  
DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN CÁNCER DE PULMÓN Y DE MAMA.**

**MODELO TRASLACIONAL Y CLÍNICO**

TESIS DOCTORAL

MARTA MARTÍN FERNÁNDEZ

MADRID, 2014





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**MARCADORES BIOQUÍMICOS EN EL ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN  
DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN CÁNCER DE PULMÓN Y DE MAMA.**

**MODELO TRASLACIONAL Y CLÍNICO**

TESIS DOCTORAL

**MARTA MARTÍN FERNÁNDEZ**

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

DIRECTORAS: **DRA. CONCEPCIÓN DE LA PIEDRA GORDO**

**DRA. CARMEN GONZÁLEZ ENGUITA**

LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR

IIS- FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

MADRID, 2014



**Dra. Concepción de la Piedra Gordo**, Jefe Asociado del Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz de Madrid y **Dra. Carmen González Enguita**, Jefe de Servicio de Urología de la Fundación Jiménez Díaz.

INFORMAN:

Que D<sup>ña</sup> **Marta Martín Fernández**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos de investigación correspondientes a la tesis doctoral: **“Marcadores bioquímicos en el estudio de la progresión de las metástasis óseas en cáncer de pulmón y de mama. Modelo traslacional y clínico”**.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a 6 de mayo de dos mil catorce.

Dra. Concepción de la Piedra

Dra. Carmen González Enguita



A mi familia





Puedes llegar a cualquier parte,  
siempre que andes lo suficiente.

**Lewis Carroll**



*Siempre supe que quería hacer la tesis. Todo el mundo me decía lo duro que se hace a veces pasar por esta etapa. Gracias a la gente que me ha acompañado en este tiempo, el camino recorrido ha sido mucho menos arduo. Después de cinco años en la Fundación Jiménez Díaz, donde he pasado muy buenos momentos de crecimiento profesional y personal, se hace difícil comenzar a escribir unas líneas adecuadas de agradecimiento a todas las personas que han pasado por mi vida, sin olvidarme de nadie.*

*Como no podía ser de otra forma, comenzaré dando las gracias a Concha, una jefa de las que no hay, porque además ha sido mi familia. Te tengo que agradecer lo mucho que siempre has pensado en mí y en trasmitirme tus conocimientos tanto dentro como fuera del laboratorio. Mucha gente debería aprender de tí, de tu entusiasmo por la ciencia y de tu calidad como investigadora.*

*También quiero dar las gracias a Carmina, cuyas aportaciones han hecho que esta tesis quedase preciosa.*

*Parecía que tener un grupo pequeño haría más fácil escribir esta parte de la tesis. Sin embargo, son muchísimas las personas que me han ayudado a llegar al final de este largo camino que con tanta ilusión he recorrido, empezando por Merche Montero, que me enseñó en mis primeros meses en la FJD y Merche Rubert que siempre se ha ofrecido cariñosamente a ayudarme con cualquier cosa.*

*Muchas gracias también a Miriam, Juan, Lidia, M<sup>a</sup> José y Antonio, mis antiguos compañeros del labo de reuma, con los que compartí mis comienzos en “esto de la ciencia” y que siempre se ofrecieron a echarme una mano.*

*Una mención especial se merecen mis compañeros del CIMA (Pamplona): Karmele, Carolina, Susana y, por supuesto, Fernando. Gracias a su colaboración hemos conseguido sacar trabajos preciosos con nuestros animalitos.*

*Ahora les toca a mis compis de reuma. A todos ellos les tengo que dar las gracias porque, aunque no hayamos sido del mismo grupo, han sido mucho más que compañeros, me han hecho reír (casi siempre a carcajadas) todos y cada uno de los días que he pasado en el laboratorio de Patología Osteoarticular de la FJD.*

*A Gabriel, Raquel y Rosa por tratarme como una más del laboratorio.*

*A Iván, Jessica y Amanda, con los que más tiempo he pasado y más momentos comparto. Nunca podré agradecerlos lo suficiente, todo lo que me habéis enseñado y la paciencia que habéis tenido conmigo. Los tres sois grandes investigadores y mejores personas.*

*A Ane, Sandra y Juan, con los que tanto me he reído hablando de la memoria del agua, comiendo sushi, bailando con tutus por la FJD, disfrazados de zombies o, simplemente haciendo un western.*

*No quiero dejar sin mencionar a Ruddy y a Natalia, que estuvieron menos tiempo en el labo, pero que dejaron un muy buen recuerdo a todos; ni a los nuevos compis Paula, Robbie y “El Alber”, espero que este sea un buen comienzo para una carrera profesional llena de ilusión.*

*Por último, dar las gracias a los compañeros de otros laboratorios, todo ellos me han aportado algo, de una forma u otra, a lo largo de estos 5 años: A los Esbrít (Marta, Ana, Dani y Sergio), con los que siempre he podido contar dentro del hospital o yendo de congreso; a los chicos de animalario (Pilar, Juani y Carlos), que me han enseñado todo lo que sé de los animales y que siempre me han ayudado con los cientos de ratas con las que he tenido que tratar; a Matí, siempre dispuesta a echar una mano con tantas ganas; a Manuel Díaz Curiel, por la ilusión con la que te implicas en la investigación básica y por pensar en mí para llevar a cabo tus proyectos, y, por último, a las chicas del laboratorio de análisis clínicos (Charo, Mercedes, Marina,...) por tener siempre buenos consejos y buenas palabras.*

*Para acabar, quiero dar las gracias a todas aquellas personas que desde fuera del laboratorio me han apoyado a lo largo de esta etapa. A mis amigas, por interesarse siempre por “mis mitocondrias” y amigos, por preguntar por mis ratitas. Sobre todo gracias a mi familia, el pilar más importante de mi vida. Sin ellos esta tesis no habría sido posible. Gracias a mis padres por enseñarme a tener ilusión por lo que hago, por apoyarme y seguirme en cada paso de mi formación. Y gracias a mi “niñito”, que ha estado a mi lado en todo momento, por su paciencia infinita, por quererme como soy.*

6 de mayo de 2014





El esqueleto representa un sitio preferente de metástasis en una variedad de tumores sólidos. Las metástasis óseas afectan gravemente a la calidad de vida y supervivencia de los pacientes. El conocimiento de su extensión y desarrollo es de gran importancia para el clínico. Las metástasis óseas producen alteraciones en el grado de remodelado del hueso y con ello un aumento de los niveles de los marcadores de remodelado óseo. En la actualidad se usan bifosfonatos, inhibidores de la actividad osteoclástica, en el tratamiento de pacientes con metástasis óseas. Uno de los más usados es el Ácido Zoledrónico. Estudios recientes sugieren que los microRNAs (pequeños RNAs no codificantes) podrían ser utilizados como marcadores para el diagnóstico de distintas enfermedades.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la evolución de los niveles de varios marcadores de remodelado óseo (de formación PINP y BGP, y de resorción CTX y FATOR5b) y su correlación con la extensión de las metástasis óseas, en un modelo experimental de cáncer de pulmón y metástasis óseas. Además, se ha tratado de identificar microRNAs como nuevos biomarcadores para el diagnóstico de esta enfermedad. Por último se ha llevado a cabo el estudio de la evolución de los marcadores de remodelado óseo (de formación FAO y de resorción NTX y  $\alpha$ CTX) en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, así como su correlación con la mortalidad, progresión de la enfermedad y eventos relacionados con el esqueleto.

Nuestros resultados apoyan la validez de los marcadores de remodelado óseo estudiados en el modelo animal de metástasis óseas tanto para la detección de la existencia de metástasis osteolíticas como para el seguimiento del tratamiento de las mismas con ácido zoledrónico. Se ha visto que los microRNAs (en concreto miR326) podrían ser herramientas útiles en la monitorización de la enfermedad metastásica ósea. Finalmente, hemos demostrado que, en las pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas tratadas con ácido zoledrónico, los niveles elevados de NTX, FAO y CTC al inicio del estudio o después de 3 meses de tratamiento con ácido zoledrónico, se asocian con un mayor riesgo de mortalidad. Los niveles basales elevados de FAO también se asociaron con la progresión de la enfermedad. Es decir, NTX, CTC, y especialmente FAO, pueden ser herramientas útiles para la evaluación del pronóstico de los pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas.





The skeleton is a preferred site of metastasis in a variety of solid tumors. Bone metastases affect quality of life and survival of patients. The knowledge of their extent and development is of great importance to the clinician. Bone metastases produce changes in the degree of bone remodeling, and thus increasing levels of markers of bone remodeling. Bisphosphonates, inhibitors of osteoclastic activity, are currently being used for the treatment of patients with bone metastases. One of the most used is the Zoledronic Acid. Recent studies suggest that microRNAs (small non-coding RNAs) could be used as markers for the diagnosis of various diseases.

The aim of this study was to analyze the evolution of the levels of several bone turnover markers (formation -PINP and BGP- and resorption -TRAP5b and CTX-) and its correlation with the extent of bone metastases in an experimental model of lung cancer and bone metastases. In addition, we tried to identify microRNAs as novel biomarkers for the diagnosis of this disease. Finally, we have carried out the study of the evolution of markers of bone remodeling (formation -BSAP- and resorption - $\alpha$ CTX and NTX-) in patients with breast cancer and bone metastases, and their correlation with mortality, disease progression and skeletal-related events.

Our results support the validity of the three bone turnover markers studied in our animal model of bone metastasis for both detecting the presence of osteolytic metastases and to monitor their treatment with zoledronic acid. It has been shown that microRNAs (especially miR326) could be useful tools for monitoring metastatic bone disease. Finally, we demonstrated that in patients with breast cancer and bone metastases treated with zoledronic acid, elevated levels of NTX, CTC and BSAP at baseline and after 3 months of treatment with zoledronic acid, were associated with increased mortality. Elevated basal levels of BSAP were also associated with disease progression. Overall, NTX, CTC, and specially BSAP, may be useful tools for the prognostic assessment of patients with breast cancer and bone metastasis.







---

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>I. EL REMODELADO ÓSEO.....</b>	<b>9</b>
<b>I.1. Marcadores de remodelado óseo.....</b>	<b>10</b>
I.1.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea .....	11
I.1.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea.....	11
<b>II. LAS METÁSTASIS ÓSEAS .....</b>	<b>12</b>
<b>II.1. Desarrollo de las metástasis óseas .....</b>	<b>14</b>
II.1.1. El “círculo vicioso” en las metástasis osteolíticas .....	14
II.1.1. El “círculo vicioso” en las metástasis osteoblásticas .....	15
<b>II.1. Consecuencias clínicas del desarrollo de metástasis óseas .....</b>	<b>17</b>
II.1.1. Tratamiento de las metástasis óseas .....	18
II.1.2. Diagnóstico y seguimiento de la presencia de metástasis óseas .....	21
II.1.2.1. Células tumorales circulantes .....	22
II.1.2.2. MicroRNA.....	23
<b>III. Comentarios finales a la introducción. ....</b>	<b>26</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>I. ESTUDIO EN MODELO DE RATÓN CON METÁSTASIS ÓSEAS .....</b>	<b>35</b>
<b>I.1. Animales y diseño experimental .....</b>	<b>35</b>
<b>I.2. Línea celular y condiciones de cultivo .....</b>	<b>36</b>
I.2.1. Transducción retroviral .....	36
I.2.1.1. Vectores virales. ....	37
I.2.1.2. Transfección de células empaquetadoras .....	37

I.2.1.3.	Infección vírica de las células diana.....	38
I.2.1.4.	Enriquecimiento y evaluación de la transducción .....	38
I.2.2.	Aislamiento de células altamente metastásicas .....	38
<b>I.3.</b>	<b>Inoculación de células tumorales vía intracardíaca .....</b>	<b>39</b>
<b>I.4.</b>	<b>Preparación y administración de los fármacos .....</b>	<b>40</b>
I.4.1.	Anestésicos .....	40
I.4.2.	Ácido zoledrónico.....	40
<b>I.5.</b>	<b>Obtención y conservación de las muestras .....</b>	<b>41</b>
<b>I.6.</b>	<b>Marcadores de remodelado óseo.....</b>	<b>41</b>
I.6.1.	Marcadores de resorción ósea .....	41
I.6.1.1.	Telopéptido carboxiterminal del colágeno I .....	41
I.6.1.2.	Isoforma 5b de la Fosfatasa ácida tartrato resistente .....	42
I.6.2.	Marcadores de formación ósea .....	43
I.6.2.1.	Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I .....	43
I.6.2.2.	Osteocalcina .....	43
<b>I.7.</b>	<b>Análisis de imagen.....</b>	<b>44</b>
I.7.1.	Bioluminiscencia .....	44
I.7.2.	Rayos X.....	45
I.7.3.	Microtomografía .....	45
I.7.4.	Histología .....	46
I.7.4.1.	Tinción Hematoxilina/Eosina .....	46
I.7.4.2.	Determinación del número de osteoclastos.....	47
<b>I.8.</b>	<b>Análisis de microRNA .....</b>	<b>48</b>
I.8.1.	Aislamiento de RNA.....	48
I.8.2.	RT-PCR cuantitativa a tiempo real para análisis de miRNA.....	48
I.8.2.1.	Síntesis de cDNA.....	48
I.8.2.2.	PCR a tiempo real .....	49

I.8.3. Validación de miRNA .....	50
I.8.3.1. Retrotranscripción .....	50
I.8.3.2. Preamplificación del cDNA.....	51
I.8.3.3. PCR cuantitativa .....	51
I.9. Análisis estadístico .....	52
<b>II. ESTUDIO DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN PACIENTES .....</b>	<b>54</b>
II.1. Pacientes y diseño del estudio .....	54
II.2. Tratamientos recibidos.....	55
II.3. Obtención y conservación de las muestras .....	56
II.4. Determinaciones bioquímicas .....	56
II.4.1. Marcadores de remodelado óseo .....	56
II.4.1.1. Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX).....	56
II.4.1.2. Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX) .....	57
II.4.1.3. Fosfatasa alcalina ósea (FAO) .....	57
II.4.2. Creatinina.....	58
II.4.3. Células tumorales circulantes (CTC) .....	58
II.5. Determinaciones clínicas .....	59
II.5.1. Eventos relacionados con el esqueleto (EREs) .....	59
II.5.2. Progresión de la enfermedad .....	59
II.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	60
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>63</b>
<b>I. ESTUDIO EN MODELO DE RATÓN CON METÁSTASIS ÓSEAS .....</b>	<b>65</b>
I.1. Caracterización del modelo animal mediante métodos de imagen.....	65
I.1.1. Cuantificación de la carga tumoral en los huesos .....	65

I.1.2.	Actividad osteolítica de las células tumorales .....	66
I.1.3.	Análisis histológico de los huesos .....	67
<b>I.2.</b>	<b>Estudio de los niveles de los marcadores de remodelado óseo.....</b>	<b>69</b>
I.2.1.	Marcadores de formación: BGP y PINP .....	69
I.2.2.	Marcadores de resorción: FATTR 5b y CTX .....	71
<b>I.3.</b>	<b>Correlación entre los marcadores y las técnicas de imagen .....</b>	<b>72</b>
<b>I.4.</b>	<b>Identificación transcriptómica de microRNAs. ....</b>	<b>73</b>
<b>I.5.</b>	<b>Correlación entre los miRNAs y las técnicas de imagen. ....</b>	<b>76</b>
<b>II.</b>	<b>ESTUDIO DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN PACIENTES .....</b>	<b>77</b>
<b>II.1.</b>	<b>Características basales de las pacientes .....</b>	<b>77</b>
<b>II.2.</b>	<b>Evolución de la enfermedad.....</b>	<b>77</b>
II.2.1.	Aparición de eventos relacionados con el esqueleto (EREs).....	77
II.2.2.	Estudio de la progresión de la enfermedad.....	77
<b>II.3.</b>	<b>Estudio de los niveles de los marcadores de remodelado óseo.....</b>	<b>80</b>
II.3.1.	Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX).....	80
II.3.2.	Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX) .....	81
II.3.3.	Fosfatasa alcalina ósea (FAO) .....	81
<b>II.4.</b>	<b>Estudio del número de células tumorales circulantes (CTCs) .....</b>	<b>83</b>
<b>II.1.</b>	<b>Capacidad predictiva de los marcadores de remodelado .....</b>	<b>83</b>
II.1.1.	Mortalidad .....	85
II.1.2.	Progresión de la enfermedad .....	89
II.1.3.	Eventos relacionados con el esqueleto .....	93
<b>II.1.</b>	<b>Correlación entre los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes.....</b>	<b>93</b>



---

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO I: CURVAS ROC.....</b>	<b>129</b>
<b>I. ANÁLISIS MORTALIDAD.....</b>	<b>131</b>
I.1. Curvas ROC según valores basales.....	131
I.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal .....	133
<b>II. ANÁLISIS PROGRESIÓN .....</b>	<b>135</b>
II.1. Curvas ROC según valores basales.....	135
II.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal .....	137
<b>III. Análisis EREs .....</b>	<b>139</b>
III.1. Curvas ROC según valores basales.....	139
III.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal .....	141
<b>ANEXO II: PUBLICACIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>I. Publicaciones relacionadas con esta tesis:.....</b>	<b>145</b>
<b>II. Otros artículos publicados durante la realización de esta tesis: .....</b>	<b>147</b>







$\mu$ TC                      Microtomografía computarizada

## A

ATCC                      *American Type Culture Collection*

AZ                          Ácido zoledrónico

## B

BGP                      Osteocalcina (*Bone Gla Protein*)

BMP                      Proteína morfogenética ósea

## C

CCD                      Dispositivo de carga acoplada

cDNA                    DNA copia

CMH                    Célula madre hematopoyética

CMM                    Células madre mesenquimales

CTC                      Célula tumoral circulante

CTX                      Telopéptido carboxiterminal de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno tipo I

## D

DAPI                    4',6-diamino-2-fenilindol

DE                        Desviación estándar

Dkk1                    Dickkopfs

DNA                    Ácido desoxirribonucleico

dsDNA                  DNA doble cadena

## E

ECO                      Equivalentes de colágeno óseo

ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> = Grupo Cooperativo de Oncología del Este
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Evolución de la enfermedad
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
EpCam	Molécula de adhesión epitelial
ERE	Evento relacionado con el esqueleto
Et-1	Endotelina-1

## F

FAO	Isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina
FATR	Fosfatasa ácida tartrato resistente
FBS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FPPS	Farnesil difosfato sintasa

## G

GFP	Proteína verde fluorescente
-----	-----------------------------

## H

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano

## I

IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleuquina
i.c.	Intracardíaco

## K

KRAS Homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata Kirsten

## M

M-CSF Factor estimulador de colonias de macrófagos

miRNA microRNA

miR microRNA

mRNA RNA mensajero

## N

NF- $\kappa$ B Factor nuclear- $\kappa$ B

NTX Telopéptido aminoterminal del colágeno I

## O

OPG Osteoprotegerina

## P

PBS Tampón fosfato salino

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PE Progresión de la enfermedad

PET Tomografía por emisión de positrones

PICP Propéptido carboxiterminal del procolágeno I

PINP Propéptido aminoterminal del procolágeno I

pNPP p-nitrofenil fosfato

pri-miRNA miRNA primario

PTHrP Proteína relacionada con la hormona paratiroidea

## R

RANK	Receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B
RC	Respuesta completa
RDI	Región de interés
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i> = Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RM	Resonancia magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	Característica Operativa del Receptor
RP	Respuesta parcial

## S

SEM	Error estándar de la media
-----	----------------------------

## T

TC	Tomografía computarizada
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante - beta
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina

## V

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
------	----------------------------------------------







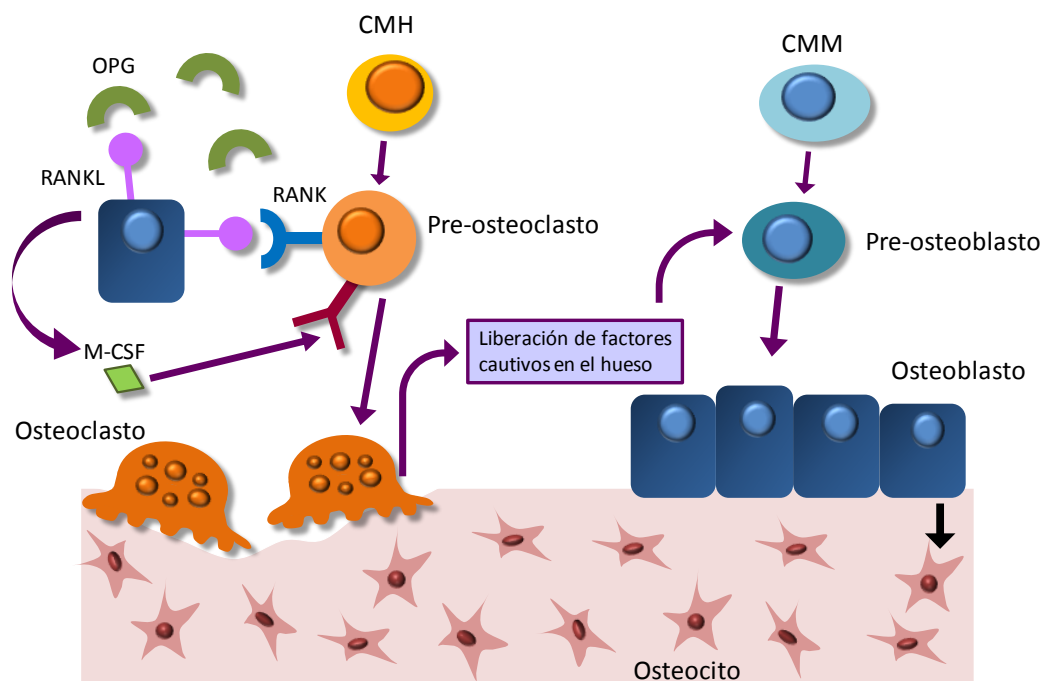
## I. EL REMODELADO ÓSEO

El hueso adulto es un tejido que está sometido de forma cíclica al proceso de remodelado óseo, mediante el cual el hueso viejo es destruido y sustituido por hueso nuevo. El remodelado óseo se lleva a cabo mediante un proceso de resorción, iniciado por las células destructoras de hueso u osteoclastos, **acoplado** a un proceso de formación, del cual se encargan las células formadoras de hueso u osteoblastos[11]. En condiciones normales, ambos procesos se encuentran en equilibrio, manteniendo así la integridad estructural del esqueleto a lo largo de la vida adulta.

El remodelado óseo comienza con el reclutamiento de pre-osteoclastos (células diferenciadas a partir de células madre hematopoyéticas o CMH), en la región que se va a remodelar, y su diferenciación a osteoclastos maduros y activos. Esta fase está regulada por los osteoblastos, a través de RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear- $\kappa$ B). Este ligando, en presencia de M-CSF (Factor estimulador de colonias de macrófagos), se une a su receptor RANK en la membrana de los pre-osteoclastos. Como consecuencia, estas células indiferenciadas se fusionan, dando lugar a células multinucleadas (osteoclastos maduros), que comienzan a resorber hueso. Los osteoblastos, además, producen Osteoprotegerina (OPG) un receptor "señuelo" de RANKL, que evita que este ligando y su receptor RANK se unan. Mediante este sistema (RANK/RANKL/OPG) los osteoblastos son capaces de regular la activación de los osteoclastos y, por tanto, el proceso de resorción ósea[48]. La activación de los osteoclastos está regulada también por otros factores como la interleuquina-1 (IL-1), IL-6, IL-11 y prostaglandinas[91]

Una vez activados, los osteoclastos se fijan a la superficie del hueso y comienzan a degradar la matriz ósea, compuesta principalmente por colágeno tipo I y cristales de hidroxapatita. Durante la resorción, factores locales cautivos en la matriz ósea (BMPs, IGF, TGF- $\beta$ ,...) son liberados[29]. Estos factores locales, junto con factores sistémicos, como PTH, estrógenos y prostaglandina, promueven la proliferación y diferenciación de los pre-osteoblastos (derivados de células madre mesenquimales o CMM) en la zona del hueso recientemente resorbida.

La diferenciación y activación de los osteoblastos hace que comience el proceso de formación, durante el cual se sintetizan los precursores del colágeno de la matriz ósea (osteoide). Además los osteoblastos se encargan de regular el proceso de mineralización de dicha matriz (**Figura 1**).



**Figura 1.** Proceso de remodelado óseo y su regulación mediante el sistema RANK/RANKL/OPG.

### **I.1. Marcadores de remodelado óseo**

Los marcadores bioquímicos de remodelado óseo son sustancias presentes en el suero y la orina, que pueden ser medidos fácilmente y que nos permiten cuantificar el grado de recambio óseo. Pueden ser proteínas o enzimas secretadas por las células óseas durante su actividad, o bien productos liberados durante la formación o la degradación del colágeno tipo I y la fase mineral que forman parte del hueso. Existen dos tipos de marcadores de remodelado óseo: de formación y de resorción. Los marcadores de **formación ósea** (como fosfatasa alcalina, osteocalcina, propéptidos del procolágeno, fosfatasa ácida tartrato resistente,...) son productos derivados de la actividad de los osteoblastos, y los de **resorción ósea** (como calcio,

hidroxiprolina, piridinolinas, telopéptidos, fosfatasa ácida tartrato resistente,...) son compuestos resultantes de la actividad osteoclástica.

### I.1.1. Marcadores bioquímicos de formación ósea

El 90% de la parte orgánica de la matriz ósea está formada por colágeno tipo I. Esta proteína tiene una estructura en forma de triple hélice de cadenas polipeptídicas, formada por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$ . Es fabricada por los osteoblastos en forma de procolágeno I. Una vez secretado por los osteoblastos, mediante la acción de peptidasas, se produce la escisión de sus extremos N-(amino) y C-(carboxi)terminal. Como consecuencia, se producen dos péptidos, **PINP (propéptido aminoterminal del procolágeno I)** y **PICP (propéptido carboxiterminal del procolágeno I)** que son liberados al suero. Por cada molécula de colágeno que sintetizan los osteoblastos, se producirá una de PINP y una de PICP, por lo que son buenos indicadores del grado de formación ósea[9].

Los osteoblastos, además, fabrican otras proteínas, que pueden ser utilizadas como marcadores de formación. La **isoenzima ósea de la fosfatasa alcalina (FAO)** es una enzima sintetizada por los osteoblastos y que es esencial durante el proceso de mineralización[31].

La **osteocalcina** (*Bone Gla-protein* o **BGP**) es otra proteína no colágena secretada por los osteoblastos durante la síntesis de la matriz ósea, por lo que en principio se utiliza como marcador de formación. Sin embargo, la BGP se integra en dicha matriz y, durante el proceso de resorción, vuelve a ser liberada y llega a la circulación. Por ello, éste, se considera más adecuadamente un marcador de remodelado óseo (formación y resorción)[42].

### I.1.2. Marcadores bioquímicos de resorción ósea

El colágeno tipo I, como se ha comentado antes, tiene forma helicoidal, excepto en sus extremos N-terminal y C-terminal. La degradación del colágeno (mediada por la catepsina K) que llevan a cabo los osteoclastos, produce unos péptidos que son diferentes de los que se producen durante la degradación del colágeno en otros tejidos: el **telopéptido aminoterminal**

del **colágeno I** (NTX) y el **telopéptido carboxiterminal de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno tipo I** (CrossLaps o CTX)[57], que se consideran marcadores de resorción ósea.

La estructura molecular del **NTX** está formada por tres fragmentos diferentes de distintas cadenas de colágeno (dos de la zona telopeptídica aminoterminal y una de la zona helicoidal), unidas entre sí por un puente de piridinolina. Este marcador se aclara por el riñón, por lo que, además de en suero, se puede encontrar en la orina[14].

El **CTX** es un fragmento de ocho aminoácidos perteneciente a la zona telopeptídica C-terminal de una cadena alfa1 del colágeno I. Se ha descrito que el CTX, es susceptible de isomerización. Dentro de su secuencia de 8 aminoácidos (EKAHDGGR), la unión DG es una región potencial de  $\beta$ -isomerización. En el colágeno de nueva síntesis el CTX tiene una estructura lineal ( $\alpha$ -CTX). Según aumenta la edad del colágeno óseo, aumenta el grado de  $\beta$ -isomerización ( $\beta$ -CTX). De hecho, en los adultos, la mayor parte del C-telopéptido se encuentra  $\beta$ -isomerizado. Este marcador de resorción ósea (en su isoforma  $\alpha$  y en la  $\beta$ ) se puede medir en suero y en orina[18].

Un marcador de resorción ósea derivado de la actividad enzimática del osteoclasto es la **fosfatasa ácida tartrato resistente** (FATR), una enzima lisosomal liberada por esta célula. El suero contiene otras isoenzimas de la fosfatasa ácida, pero sólo la procedente de los hematíes y la ósea son resistentes al tartrato. Existen dos isoformas de esta enzima (5a y 5b), de ellas la 5b es específicamente expresada por los osteoclastos y es liberada a la circulación durante el proceso de resorción del hueso. Dada la actividad de la FATR5b, esta enzima resulta un buen biomarcador para cuantificar el número de osteoclastos en cortes histológicos[18].

## II. LAS METÁSTASIS ÓSEAS

Las metástasis (diseminación de células tumorales en un órgano distinto del órgano de origen) son el proceso más devastador del cáncer y van asociadas a un mal pronóstico. El hueso es el órgano más comúnmente afectado en los cánceres metastásicos. Ciertos tumores (mama, próstata, riñón, tiroides y pulmón) muestran mayor afinidad por el hueso que otros. La **tabla 1** muestra los datos de incidencia de las metástasis óseas en función del tumor primario[24].

**Tabla 1. Incidencia de las metástasis óseas en diferentes cánceres, examinados *post mortem*.**

Tumor primario	Incidencia de metástasis óseas (%)	
	Mediana	Rango
Mama	67	47-85
Próstata	66	33-85
Tiroides	38	28-60
Pulmón	36	30-55
Riñón	34	33-40

Datos adaptados de Buijs[12]

La predisposición de algunos cánceres por metastatizar en el hueso de forma específica se debe en parte a la estructura capilar de la médula ósea y al lento flujo sanguíneo dentro de ella[22]. Sin embargo, las condiciones físicas del hueso, no son el único evento determinante para la anidación de las células tumorales en el hueso. En 1889, Stephen Paget propuso la teoría "*seed and soil*" (semillas y suelo)[78], según la cual la tendencia de las células tumorales por metastatizar en órganos específicos es similar a la predisposición de ciertas semillas (las células tumorales) por crecer en suelos fértiles (el órgano metastatizado). El hueso es una gran fuente de factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ , el factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y calcio, que aportan un "suelo fértil" en el cual las células pueden crecer[50].

Recientemente, se ha propuesto un nuevo modelo para explicar la preferencia de las células tumorales por metastatizar órganos determinados. Según esta teoría, no sólo es importante el microambiente óseo, sino que además el propio tumor primario secreta ciertos factores que preparan al órgano diana para que pueda albergar a las células tumorales diseminadas (nicho pre-metastásico). Como respuesta a los factores solubles liberados por el tumor primario, las células precursoras hematopoyéticas y los macrófagos presentes en el microambiente óseo, crean un "suelo fértil" favorable para ser invadido por las células tumorales metastásicas[80].

## II.1. Desarrollo de las metástasis óseas

La metástasis es un proceso que incluye varios pasos hasta que las células de un tumor primario colonizan un órgano distante. En primer lugar, las células tumorales, de origen epitelial, tienen que proliferar y adquirir un fenotipo con capacidad invasiva, proceso denominado *transición epitelio-mesénquima (TEM)*[92]. Las células tumorales promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), necesarios para aportar nutrientes y oxígeno al tumor y que éste continúe creciendo. Además, los nuevos vasos suponen una vía para la diseminación y metástasis[8]. Mediante la secreción de enzimas proteolíticas, las células tumorales rompen el endotelio de los vasos neoformados y entran en la circulación. Estas células tumorales circulantes (CTCs) viajan por el torrente sanguíneo hasta los órganos (hueso) que van a colonizar. Cuando las CTCs llegan al hueso, quedan atrapadas en los capilares de la médula ósea, se adhieren al endotelio y se produce, posteriormente, su extravasación[75].

Cuando llegan al hueso, comienza un círculo vicioso en el cual estas células tumorales y las células óseas se retroalimentan. En ello están implicados muchos factores del microambiente óseo, así como factores secretados por las propias células tumorales. Existen dos tipos de metástasis óseas, **osteolíticas** y **osteoblásticas**, según las células tumorales estimulen la actividad de los osteoclastos o de los osteoblastos, respectivamente. Además, los pacientes pueden desarrollar ambos tipos de metástasis, es decir **metástasis mixtas** con componente osteolítico y osteoblástico[82]. En función del tipo de tumor primario, se producirán distintos factores que estimulan la actividad de los osteoblastos o de los osteoclastos, dando lugar a la formación de metástasis de uno u otro tipo.

### II.1.1. El “círculo vicioso” en las metástasis osteolíticas

Las células metastásicas de tipo osteolítico se caracterizan por producir un aumento de la actividad de los osteoclastos del huésped, dando lugar a la destrucción del hueso, que radiográficamente se distinguirá por la aparición de agujeros en la región cortical. Histológicamente se caracteriza por la presencia de osteoclastos erosionando el hueso en la

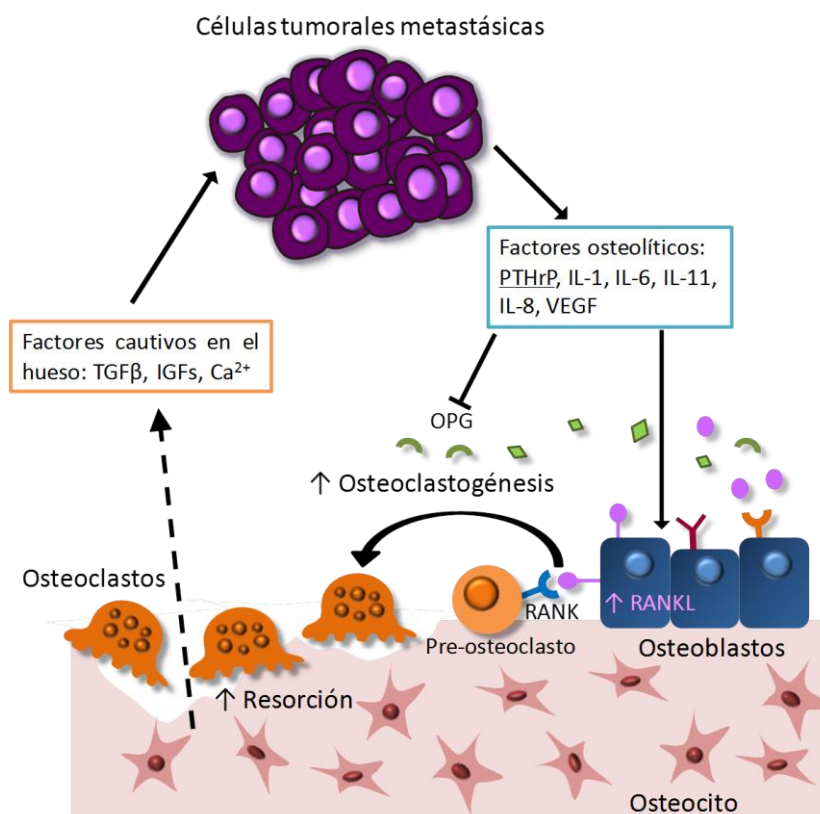


interfase tumor-hueso[54]. El cáncer de pulmón, riñón y mama desencadenan preferentemente la activación de los osteoclastos, dando como resultado la aparición de lesiones osteolíticas[12].

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), liberada por las células metastásicas, es el principal mediador de la activación de los osteoclastos en las metástasis osteolíticas. Esta proteína estimula a los osteoblastos para que expresen más RANKL y menos OPG. Como se ha explicado anteriormente, el resultado es la activación de la osteoclastogénesis y el aumento de la resorción del hueso. La destrucción de hueso, provoca la liberación de factores de crecimiento cautivos en el hueso (TGF $\beta$ , IGFs,...) y el aumento de la concentración de calcio. Todos estos factores, se unen a sus receptores en la membrana de las células tumorales y estimulan su crecimiento, así como la síntesis de PTHrP. Además de PTHrP, las células tumorales producen múltiples citoquinas que inducen la osteolisis, como son IL-1, IL-6, IL-11, IL-8 y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)[6,55,83]. Se establece, por tanto, un círculo vicioso en el que se induce el crecimiento de las células tumorales y la actividad de los osteoclastos (**Figura 2**).

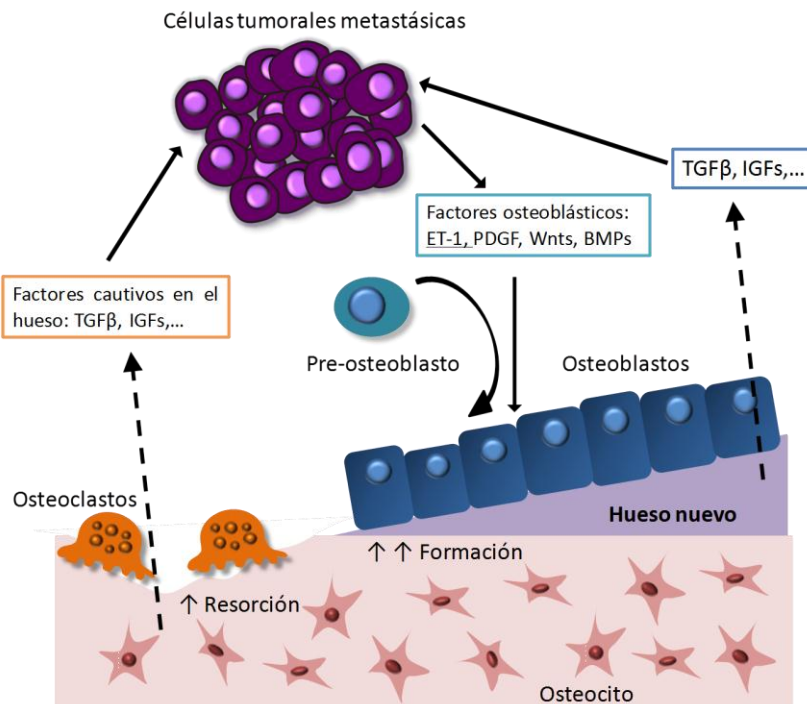
### **II.1.1. El “círculo vicioso” en las metástasis osteoblásticas**

Las células metastásicas de tipo osteoblástico se caracterizan por producir un aumento en la actividad de los osteoblastos, lo que se traduce en un incremento en la formación de hueso nuevo. En las radiografías, este tipo de metástasis se identifican por ser regiones de hueso más densas (osteoscleróticas). El análisis histopatológico de las metástasis osteoblásticas muestra la presencia de un gran número de osteoblastos cercanos a las células tumorales[52].



**Figura 2. El círculo vicioso en las metástasis osteolíticas.** La liberación de factores osteolíticos (PTHrP,...) por parte de las células metastásicas, hace que los osteoblastos aumenten la síntesis de RANKL. La unión RANKL/RANK induce la diferenciación de los precursores de osteoclastos en osteoclastos funcionales. La actividad de estas células provoca osteolisis, y como consecuencia, la liberación de diversos factores cautivos en el hueso (TGFβ, IGFs,...). Estos factores inducen la proliferación de las células tumorales y su supervivencia, lo que resulta en un bucle de retroalimentación, denominado el "círculo vicioso" de las metástasis osteolíticas.

El principal modulador del desarrollo de las metástasis osteoblásticas es la Endotelina-1 (Et-1) liberada por las células metastásicas. Esta proteína estimula la proliferación de los osteoblastos mediante la inhibición de dickkopfs (DKK1), un inhibidor de la vía Wnt (vía de señalización celular encargada de la diferenciación y activación de los osteoblastos)[91]. Las células tumorales además producen otros factores activadores de osteoclastos (BMPs, PDGF,...). Una vez diferenciados, los osteoblastos comienzan a formar nueva matriz no mineralizada, sobre el hueso ya existente. Ésta contiene factores de crecimiento y otras proteínas que atraen a las células tumorales y les permiten sobrevivir, crecer y proliferar (Figura 3).



**Figura 3. Fisiopatología de las metástasis osteoblásticas.** La liberación de endotelina-1 (ET-1) y otros factores, por parte de las células tumorales, hace que los pre-osteoblastos se diferencien. Los osteoblastos maduros comienzan a formar nueva matriz no mineralizada, sobre el hueso ya existente, rica en factores como TGF $\beta$  que estimulan el crecimiento de las células tumorales. Se establece un "círculo vicioso" que favorece el desarrollo de las metástasis osteoblásticas.

Por otra parte, y aunque parezca contradictorio, las células tumorales expresan PTHrP que, como se ha visto antes, estimula la osteoclastogénesis. Este hecho es importante, ya que se necesita que haya resorción para que comience la formación de hueso. Los osteoblastos que se están desarrollando, también producen RANKL y, por tanto, también inducen la osteoclastogénesis. La resorción ósea que tiene lugar durante el desarrollo de las metástasis óseas libera factores cautivos en la matriz, que estimulan, a su vez, el crecimiento de las células tumorales[52].

## II.1. Consecuencias clínicas del desarrollo de metástasis óseas

Las consecuencias de las metástasis óseas son a menudo devastadoras. La supervivencia de los pacientes afectados de metástasis óseas varía considerablemente en función del tumor

primario que padezca. En el caso del cáncer de mama y de próstata, el tiempo de supervivencia desde el diagnóstico, se mide en años. Sin embargo, en los pacientes con cáncer de pulmón, se mide en meses (**Tabla 2**)[23,35]. Son diversas las características de cada tipo de tumor que son consideradas factores pronósticos (por ejemplo, el estado de los receptores de estrógeno en los pacientes con cáncer de mama).

**Tabla 2. Pronóstico de las metástasis óseas en función del tumor primario**

Tumor primario	Supervivencia	
	Mediana (meses)	A 5 años (%)
Mama	24	20
Próstata	40	25
Pulmón	<6	<5
Tiroides	48	40
Riñón	6	10

Datos adaptados de Coleman[24]

Los pacientes afectados de metástasis óseas presentan una significativa morbilidad y sufrimiento. Las metástasis osteolíticas pueden causar dolor severo, fracturas patológicas, hipercalcemia potencialmente mortal y compresión de la médula espinal. Los pacientes con metástasis osteoblásticas tienen dolor óseo y fracturas patológicas debido a la mala calidad de sus huesos. Estas complicaciones se denominan **eventos relacionados con el esqueleto o EREs**. Éstos, pueden causar una debilitación significativa del paciente, así como afectar gravemente a su calidad de vida e independencia funcional. De media, un paciente sufrirá una de estas complicaciones cada 3 – 6 meses[57].

### II.1.1. Tratamiento de las metástasis óseas

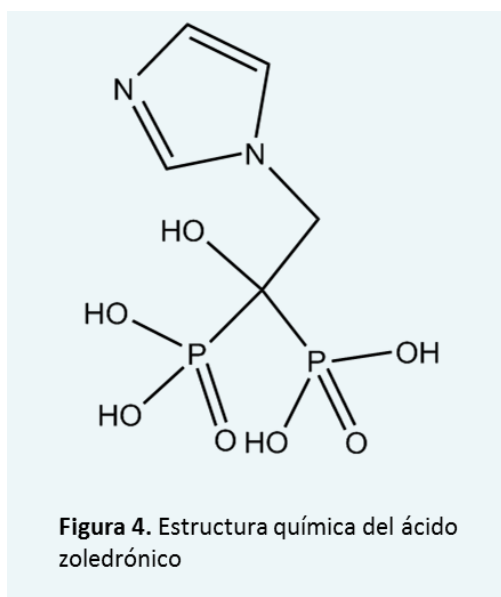
El tratamiento de las metástasis óseas, se centra principalmente en la reducción de la morbilidad debida a los EREs y en el aumento de la calidad de vida de los pacientes: aliviar el dolor, prevenir la aparición de fracturas patológicas, evitar compresión de la médula espinal,

aumentar la capacidad de movimiento y prolongar la supervivencia. El tipo de tratamiento que se elige para cada paciente depende, por tanto, de las condiciones clínicas del paciente en general, la esperanza de vida y la calidad de vida del mismo.

Dentro de los posibles tratamientos para las metástasis óseas se encuentran los analgésicos (desde antiinflamatorios no esteroideos hasta opiáceos), radiación (radioterapia o radiofármacos), cirugía (tratamiento de las fracturas patológicas y compresión de la médula espinal), quimioterapia, terapia hormonal y tratamientos dirigidos al hueso[99].

En el caso de los tratamientos dirigidos contra el hueso, se trata de frenar la actividad de los osteoclastos y de los osteoblastos, aumentada de forma anormal por la presencia de las metástasis tumorales. Dentro de este grupo, en la práctica clínica se utilizan comúnmente los bifosfonatos. Recientemente, se ha empezado a utilizar también el fármaco denosumab en el tratamiento de las metástasis óseas. Sin embargo, en esta tesis nos vamos a centrar en la acción de los **bifosfonatos** sobre el hueso durante el desarrollo de la enfermedad metastásica ósea, y más concretamente, del **ácido zoledrónico**.

Los **bifosfonatos** son análogos sintéticos de pirofosfato, en los que se sustituye el oxígeno central por un carbono. De éste parten dos radicales, uno de las cuales contiene un grupo hidroxilo con gran afinidad por el fosfato cálcico (hidroxiapatita) de la matriz ósea[76]. Estos fármacos actúan sobre el hueso inhibiendo la actividad de los osteoclastos. Se dividen en dos tipos, según el otro radical sea o no nitrogenado. Esta característica supone diferencias en



cuanto al mecanismo de acción y a la potencia del fármaco (mucho mayor en los bifosfonatos nitrogenados)[94].

El **ácido zoledrónico (Figura 4)** es un bifosfonato nitrogenado de tercera generación. Este tipo de bifosfonatos actúa sobre el metabolismo óseo mediante el bloqueo de la enzima farnesil difosfato sintasa (FPPS) en la vía del mevalonato. Esto provoca un bloqueo de la prenilación (la función de los osteoclastos se ve afectada) y la inducción de la

apoptosis de los osteoclastos[46]. Dentro de los bifosfonatos nitrogenados, el ácido zoledrónico es el que mayor afinidad por el hueso ha demostrado[76].

En el tratamiento de las metástasis óseas, la inhibición de la resorción, por medio del ácido zoledrónico, hace que se interrumpa el círculo vicioso anteriormente descrito, dando lugar a una disminución de las lesiones óseas y, a su vez, a un descenso de la carga tumoral en el hueso. Además, es importante tener en cuenta que gracias al fenómeno de acoplamiento, los bifosfonatos pueden utilizarse tanto para el tratamiento de las metástasis osteolíticas, como para el tratamiento de las osteoblásticas[75].

Por otra parte, en los último años, diversos estudios preclínicos han demostrado que, aparte de su efecto antirresortivo, el ácido zoledrónico posee cierta acción antitumoral, ya que se ha visto que es capaz de inhibir la viabilidad [4,37,53,89,90,93], migración, invasión[7,32] e incluso la transición epitelio-mesénquima de las células tumorales[88].

Los bifosfonatos han mostrado ser beneficiosos en el tratamiento de las metástasis óseas en diversos ensayos clínicos. El ácido zoledrónico es el único bifosfonato que consigue reducir el dolor de forma sostenida en el tiempo, además de retrasar la aparición del primer ERE y de reducir significativamente la incidencia de estos eventos, en comparación con tratamientos placebo[73]. Éste es también el único bifosfonato que ha demostrado ser eficaz en pacientes con metástasis óseas derivadas de diversos tumores sólidos (mama y próstata, e incluso pulmón y carcinoma de células renales)[21].

Cada vez son más los ensayos clínicos que intentan comprobar la eficacia de los bifosfonatos en la prevención de las metástasis óseas derivadas de distintos tumores primarios: El estudio en fase III AZURE en pacientes con cáncer de mama[20], ZEUS en el estudio del cáncer de próstata y los estudios G2419 y Z-PACT en pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas[61]. Los resultados de estos trabajos están mostrando la validez de los bifosfonatos, especialmente el ácido zoledrónico, como terapia adyuvante en el tratamiento de estos cánceres antes del desarrollo de las metástasis óseas.

### **II.1.2. Diagnóstico y seguimiento de la presencia de metástasis óseas**

El diagnóstico y seguimiento de las metástasis óseas pueden ser tareas difíciles, sobre todo en pacientes asintomáticos. Las técnicas más utilizadas para detectar la presencia de lesiones óseas son la gammagrafía, radiografías, tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM). Últimamente, se están utilizando también la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de positrones/tomografía computarizada (PET/TC). La principal técnica de imagen utilizada es la gammagrafía, dada su gran sensibilidad. En casos de escasa especificidad y para la confirmación de los resultados, se utilizan las radiografías, TC y resonancia magnética.

Todas estas técnicas tienen ciertas limitaciones: Escasa sensibilidad, son técnicas caras, uso de radiación (rayos X o tecnecio-99). Sin embargo, la más importante de sus limitaciones es que no son capaces de detectar cambios patológicos en el hueso, antes de ser sintomáticos[50]. Por estas razones, para el clínico se hace necesario tener marcadores predictivos de la existencia de metástasis óseas, así como herramientas para el seguimiento de los tratamientos.

Como hemos mencionado anteriormente, durante la enfermedad metastásica ósea, las células tumorales interaccionan con el microambiente óseo, la médula ósea y las células del hueso, provocando alteraciones en el metabolismo normal de este tejido. Por este motivo, los marcadores de remodelado óseo (sección I.1.), determinados en suero y orina, podrían ser herramientas muy útiles y relativamente poco invasivas en el diagnóstico de las metástasis óseas y su respuesta a los distintos tratamientos. Diferentes estudios de investigación clínica han sugerido que los niveles de estos marcadores se correlacionan con la presencia, extensión y pronóstico de las metástasis óseas. El análisis retrospectivo de tres amplios estudios aleatorizados fase III en pacientes con metástasis óseas de cáncer de mama, próstata y otros tumores sólidos, ha demostrado evidencias del valor pronóstico de los marcadores óseos, incluyendo eventos relacionados con el esqueleto, progresión de la enfermedad y muerte. También se ha sugerido que la reducción del nivel de remodelado óseo puede retrasar la propia enfermedad y mejorar la supervivencia de los pacientes[63,65,69]. Por otra parte, la sensibilidad y especificidad de los marcadores no es la misma con respecto a los distintos tipos

de metástasis (osteolíticas u osteoblásticas). Sería necesario realizar más estudios al respecto. También sería interesante y de gran ayuda estudiar la posible relación entre las variaciones de los niveles de los marcadores de remodelado óseo, y el número y tamaño de las metástasis óseas.

Por otro lado, la cuantificación del número de CTCs en sangre (sección II.2.2.1.), está siendo muy utilizada en los últimos años en la práctica clínica, en cánceres diseminados[2]. Se ha sugerido que dichas células podrían tener un papel pronóstico en la enfermedad metastásica [5]. Diversos estudios han correlacionado los niveles de las CTCs con la progresión, el pronóstico y la mortalidad en pacientes con cáncer de mama metastásico[2,3,27,41].

Por último, los microRNAs (sección II.2.2.2.), pequeños RNA no codificantes, han sido sugeridos como posibles biomarcadores detectables en suero, para el diagnóstico clínico de distintas enfermedades[1], y podrían ser válidos también para detectar la presencia de metástasis óseas.

### **II.1.2.1. Células tumorales circulantes**

La presencia de las células tumorales circulantes en la sangre periférica de los pacientes está asociada con la diseminación de los cánceres primarios, con un mayor riesgo de progresión de dichos tumores[5] y con la disminución de la supervivencia de los pacientes[27]. Las CTCs pueden ser detectadas en la sangre de los pacientes con metástasis antes de que se presente cualquier tipo de sintomatología clínica[49]. Además, la cuantificación de las CTCs en diferentes tiempos durante el tratamiento de las metástasis, ha demostrado ser una alternativa potencial y no invasiva para la monitorización de las terapias [41].

Los métodos más utilizados para la detección de estas células en sangre, usan anticuerpos dirigidos contra la *molécula de adhesión celular epitelial* o EpCam (se sobreexpresa en las células de muchos tumores malignos epiteliales), tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol o DAPI (distingue entre células nucleadas y desechos celulares no nucleados), e inmunofluorescencia con anticuerpos anti-citoqueratina (demuestra su origen epitelial) y CD45 (descarta que las células sean leucocitos)[95].



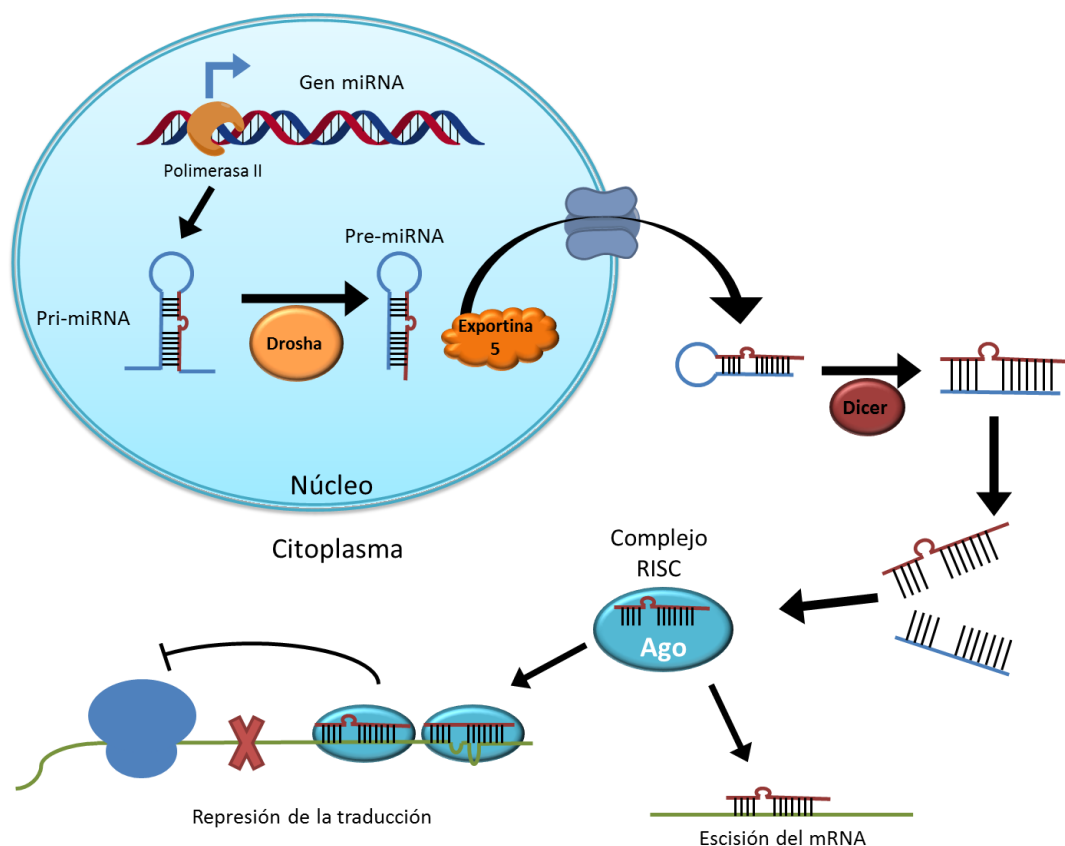
Las CTCs se encuentran en pequeñísimas cantidades en la sangre, del orden de una CTC por cada  $10^9$  células sanguíneas, en la mayoría de los carcinomas. Aunque resulte obvio, es importante decir que estas células están ausentes en la sangre de individuos sanos[3]. Sin embargo, en la práctica clínica se toma como punto de corte 5CTC/7,5ml de sangre. Este punto de corte fue establecido en un estudio de Cristofanilli y cols. [27] por ser altamente predictivo de la progresión de la enfermedad y la supervivencia en general de pacientes con cáncer de mama metastásico.

### II.1.2.2. MicroRNA

Los miRNAs (microRNAs) son pequeños RNAs no codificantes de una sola hebra de ~22 nucleótidos, que regulan negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional. Los genes cuya expresión se ve modulada por los miRNAs, están implicados en todo tipo de procesos (desarrollo, proliferación, apoptosis y respuesta al estrés)[28]. Estos pequeños RNAs residen en regiones del genoma en unidades transcripcionales o grupos policistrónicos. Aproximadamente la mitad de miRNAs conocidos residen en el RNA no codificante de proteínas (intrones y exones) o en los intrones de genes que codifican proteínas [81]. Un solo miRNA puede regular negativamente varias decenas de genes. Estos miRNAs se comportan generalmente como genes supresores de tumores, su expresión se encuentra reprimida en los tumores. Por otra parte, algunos miRNAs se encuentran sobreexpresados en los tumores, se comportan como oncogenes (OncomiR)[58].

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, donde son transcritos por la RNA polimerasa II, que genera una molécula larga de RNA no codificante, conocida como miRNA primario (pri-miRNA), cuya secuencia es capaz de aparearse consigo misma y formar una estructura en forma de horquilla[59]. Posteriormente, una enzima nuclear llamada Drosha corta las bases de la horquilla, formando lo que se denomina pre-miRNA. Este pre-miRNA es transportado desde el núcleo al citoplasma por la Exportina 5. Una vez que el pre-miRNA está en el citoplasma es fragmentado por la enzima Dicer, formando un miRNA de doble cadena con una longitud final de 20-25 nucleótidos[96]. Este miRNA dúplex se desenrolla por una helicasa y la cadena madura, junto con la proteína Ago, forman el complejo de silenciamiento (RISC). Este complejo regula la expresión génica, uniéndose a la región 3'UTR (*untranslated*

región) de los mRNA diana, y produciendo la degradación de este mRNA o mediante la inhibición de su traducción (**Figura 5**).



**Figura 5.** Biogénesis y mecanismo de acción de los microRNAs.

Desde que en 2002 Calin y cols[13] describieron la implicación de dos miRNAs (miR 15 y 16) en la leucemia linfática crónica, se han publicado diversos trabajos en los cuales se ha demostrado que alteraciones en la expresión de ciertos miRNAs se encuentran implicadas en diversas neoplasias en humanos[28]. De hecho, algunos miRNAs juegan un papel importante en el desarrollo de metástasis: forman parte de complejas vías de señalización, regulando la expresión de señales pro o antimetastásicas[77]. En concreto, en los últimos años se ha descrito la implicación de diversos miRNAs en la formación de las metástasis óseas (**Tabla 3**).

Los miRNAs pueden ser detectados y determinados en los tejidos, así como en los fluidos corporales incluyendo plasma, suero, orina, saliva, e incluso en la leche y el semen. Es muy importante destacar, el hecho de que los miRNAs circulantes son muy estables tanto en suero

como en plasma[84]. Algunos estudios sugieren que esta estabilidad es debida a que los miRNAs se encuentran incorporados en el interior de micropartículas y exosomas[96]. Además de estas características, los miRNAs tienen otras que los hacen susceptibles de ser considerados posibles biomarcadores para el diagnóstico e incluso pronóstico de los pacientes con metástasis óseas u otras enfermedades: 1) Su expresión se ve modificada en los procesos tumorales (en las metástasis óseas en concreto), 2) Poseen patrones de expresión específicos de tejido o de ciertos procesos biológicos, 3) Dada su presencia en biofluidos, la extracción de muestras resulta simple y no invasiva, 4) el nivel de miRNAs se puede medir fácilmente por PCR cuantitativa, lo que permite la amplificación de la señal con una alta precisión[1].

Tabla 3. Micro ARNs asociados a la formación de metástasis óseas			
Nombre del miARN	Cáncer primario	Función	Observaciones
miR-7	Mama	Supresor de tumor	Inhibe la capacidad de metastatizar de las células tumorales
miR-17-92	Mama	OncomiR	Estimula la invasión tumoral
miR-30	Mama	Supresor de tumor	Inhibe la integración de las células tumorales en el hueso y reduce la formación de metástasis óseas
	Próstata		Inhibe la invasión tumoral
miR-33a	Pulmón	Supresor de tumor	Inhibe la expresión de PTHrP en las células tumorales y reduce la formación de lesiones osteolíticas
miR34a	Próstata	Supresor de tumor	Inhibe la formación de metástasis reprimiendo la expresión de CD44 en las células tumorales
miR-143	Próstata	Supresor de tumor	Inhibe la invasión tumoral y la formación de metástasis óseas
miR-145	Próstata	Supresor de tumor	Inhibe la invasión tumoral y la formación de metástasis óseas
miR-203	Próstata	Supresor de tumor	Inhibe la invasión tumoral y la formación de metástasis óseas Inhibe la expresión de Runx2
miR-218	Mama	OncomiR	Estimula la integración de las células tumorales en el hueso
miR-335	Mama	Supresor de tumor	Inhibe la invasión tumoral y la formación de metástasis
miR-373	Mama	OncomiR	Estimula la invasión tumoral
miR-520c	Mama	OncomiR	Estimula la invasión tumoral

### **III. Comentarios finales a la introducción.**

1. La metástasis es el proceso más devastador del cáncer y va asociada con un mal pronóstico. El esqueleto representa un sitio preferente de metástasis en una variedad de tumores sólidos. Los pacientes afectados de metástasis óseas experimentan una significativa morbilidad incluyendo dolor, hipercalcemia y compresión medular que conlleva fracturas patológicas que dificultan la movilidad. Estos eventos relacionados con el esqueleto implican una reducción de la calidad de vida y la supervivencia. Además constituyen un peso gravoso para la sanidad pública.

Durante el proceso metastásico, las células cancerígenas procedentes de un tumor primario escapan del órgano de origen, se extravasan y pasan a la circulación. Cuando estas células tumorales circulantes llegan a un órgano diana, en el que encuentran un “suelo fértil”, anidan en él y proliferan. Una vez en el hueso, las células metastásicas comienzan a liberar diversos factores que hacen que aumente de forma exagerada la actividad de los osteoblastos, en el caso de las metástasis osteoblásticas (Et-1, BMPs, Wnt,...), o de los osteoclastos, en el caso de las metástasis osteolíticas (PTHrP, IL-6, IL-11,...). El aumento del grado de remodelado óseo, hace que se liberen factores cautivos en la matriz ósea, que favorecen, a su vez, el crecimiento de las células tumorales. De esta forma, se establece un círculo vicioso entre el tumor y el huésped. Es importante tener en cuenta que al aumentar la actividad osteoblástica u osteoclástica, el organismo trata de compensar y se produce el fenómeno de acoplamiento, aumentando también la actividad osteoclástica u osteoblástica, respectivamente.

2. Desde hace algunos años, se vienen usando bifosfonatos, compuestos cuya acción directa es la inhibición de la actividad osteoclástica, en el tratamiento de los pacientes con metástasis óseas asociadas al cáncer. Se ha llegado recientemente a la conclusión de que los bifosfonatos, no sólo disminuyen la destrucción del hueso del huésped en el caso de las metástasis osteolíticas, sino también en el caso de las osteoblásticas (por el fenómeno de acoplamiento). Al disminuir en ambos casos la resorción ósea, el círculo vicioso queda interrumpido, hecho que contribuye también a frenar el crecimiento de las metástasis óseas. Se han utilizado prácticamente todos los bifosfonatos existentes en el mercado para el tratamiento de las metástasis óseas, pero en la actualidad el bifosfonato de elección es el ácido zoledrónico, de

gran potencia y que permite aplicar las dosis en períodos muy separados en el tiempo. Como se puede deducir del mecanismo de acción de los bifosfonatos, la administración de ácido zoledrónico produce una disminución del remodelado óseo en pacientes con metástasis en que las actividades osteoclástica y osteoblástica se encuentran muy elevadas.

3. La presencia de células metastásicas en el hueso altera el equilibrio normal de remodelado óseo. Por ello, los pacientes con metástasis óseas presentan un elevado grado de remodelado óseo, si se comparan con individuos sanos, que es proporcional a la extensión de las metástasis óseas. Dado que los marcadores bioquímicos de remodelado óseo han demostrado ser indicadores sensibles y específicos (en diferente grado) del estado de los procesos de formación y de resorción ósea, es lógico pensar que pueden ser herramientas útiles para cuantificar el grado de remodelado óseo en presencia de metástasis óseas tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con bifosfonatos como el ácido zoledrónico. Existen diversos trabajos en la literatura que sugieren que existe correlación entre los niveles de los marcadores de remodelado óseo y la presencia, extensión y pronóstico de las metástasis óseas.

4. Los microRNAs son pequeños RNAs no codificantes de una sola hebra de 20-25 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. Los miRNAs controlan funciones celulares básicas incluyendo proliferación, diferenciación y apoptosis, así como respuesta al estrés. Por ello, pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer y las metástasis. El patrón de expresión de los miRNAs se correlaciona en algunos casos con el tipo de cáncer, su estado y otras variables clínicas. Estos pequeños RNAs se liberan al medio extracelular en microvesículas o en exosomas, por lo que se pueden detectar en la circulación y otros fluidos corporales. Por todo ello, los miRNAs podrían ser también herramientas útiles para el diagnóstico y seguimiento de los procesos tumorales, y en concreto de las metástasis óseas.

5. El desarrollo de herramientas de diagnóstico de metástasis óseas es un tema que presenta tanta actualidad que en los últimos años se han celebrado diversas reuniones con investigadores de reconocida importancia en este campo. Las conclusiones que se alcanzan al tener toda esta información son las siguientes:

Es necesario tener marcadores predictivos de la existencia de metástasis óseas, así como herramientas para el seguimiento de los tratamientos. Posiblemente, los marcadores bioquímicos de remodelado óseo, las células tumorales circulantes y los microRNAs puedan serlo. Por otra parte, es probable que la sensibilidad y la especificidad de todos los marcadores no sea la misma con respecto a los distintos tipos de metástasis: osteoblásticas u osteolíticas. Sería necesario hacer estudios al respecto. También sería de gran ayuda estudiar la posible relación entre las variaciones de los niveles de los distintos marcadores bioquímicos y la proporción con el número y tamaño de las metástasis.

Hasta el momento no existen estudios sistemáticos que permitan dilucidar la importancia de los marcadores bioquímicos así como su correlación con la progresión metastásica. Los estudios realizados en humanos presentan la dificultad añadida de la diferente situación de los pacientes al tratar de realizar estudios estadísticos: edad, sexo, condiciones basales de salud,... Este tipo de estudios de correlación de marcadores con la carga tumoral y el grado de osteolisis/osteosclerosis sólo puede realizarse en animales. Su consecución sería de gran importancia clínica pues permitiría sentar las bases para una correcta interpretación de los marcadores bioquímicos en el contexto de la progresión metastásica ósea. Esta progresión es dependiente de cada tipo de tumor, así como de las características fisiopatológicas de cada uno de ellos y del grado de osteolisis que produzcan. El tema es de gran importancia clínica tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del desarrollo de las metástasis óseas. Por ello, una vez analizados los marcadores bioquímicos mediante modelos animales, es muy importante validar los resultados analizando dichos biomarcadores en pacientes con metástasis óseas, y tratar de correlacionarlos con el estado de la enfermedad. De esta forma se conseguiría obtener marcadores fiables para el diagnóstico de pacientes con metástasis óseas, así como para el seguimiento del tratamiento de dicha enfermedad.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se hace necesario llevar a cabo los objetivos que se detallan a continuación.







**OBJETIVO 1.** Estudio de la correlación entre el daño óseo y el número de células tumorales debidos a la presencia de metástasis óseas y los niveles de marcadores bioquímicos de remodelado óseo, de formación (BGP y PINP) y de resorción (CTX y FATTR5b) en un modelo experimental de ratón con metástasis osteolíticas.

**OBJETIVO 2.** Estudio del efecto producido por la administración del bifosfonato ácido zoledrónico en el modelo experimental de metástasis óseas en cuanto a la disminución de la afectación ósea y la carga tumoral, así como su efecto sobre los niveles de remodelado óseo.

**OBJETIVO 3.** Identificación de microRNAs como nuevos marcadores bioquímicos que se correlacionen con la extensión de las metástasis óseas en nuestro modelo animal.

**OBJETIVO 4.** Estudio de la evolución de los marcadores de remodelado óseo (NTX,  $\alpha\alpha$ CTX y FAO) y de las CTCs en mujeres con cáncer de mama y metástasis óseas tras el tratamiento con ácido zoledrónico, y su correlación con la mortalidad, progresión de la enfermedad y la aparición de eventos relacionados con el esqueleto.







## I. ESTUDIO EN MODELO DE RATÓN CON METÁSTASIS ÓSEAS

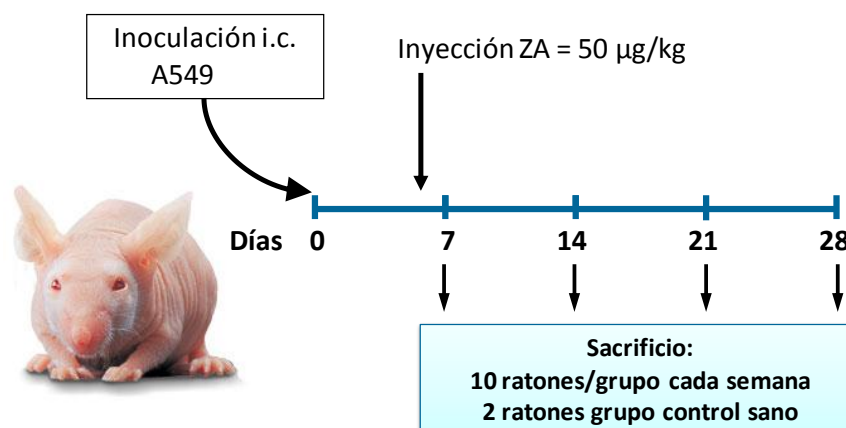
### I.1. Animales y diseño experimental

Se estudió un modelo de ratón con cáncer de pulmón y metástasis osteolíticas. Se utilizó un total de 90 ratones atímicos desnudos (Harlan Laboratories Barcelona) de 3 – 4 semanas de edad al inicio del estudio. Estos ratones poseen un timo disfuncional, por lo que son deficientes en células T. Por estas características, los ratones atímicos desnudos no presentan respuesta injerto contra huésped. Los animales se mantuvieron en condiciones de 22°C, ciclos de 12 horas de luz y oscuridad, acceso libre a la comida y agua de bebida y en un ambiente libre de patógenos. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales utilizados se dividieron en tres grupos de la siguiente manera:

- Grupo tumoral no tratado (n = 40): Los animales fueron inoculados con células A549 mediante inyección intracardíaca (i.c.) y tratados con agua estéril de inyección 5 días después de la inoculación de dichas células.
- Grupo tumoral tratado (n = 40): Los animales fueron inoculados con células A549 mediante i.c. y tratados con 50µg/kg de Ácido zoledrónico 5 días después de la inoculación de las células.
- Grupo control sano (n = 10): Se inoculó a los animales PBS mediante i.c.

Se realizó un seguimiento de cada grupo de ratones mediante bioluminiscencia y rayos X los días 7, 14, 21 y 28 postinoculación. Cada día de estudio se sacrificaron 10 animales de cada grupo inoculado con células A549 (tratados y no tratados) y 2 del grupo control sano (**Figura 6**). Se recogieron las muestras (suero y patas) de todos los animales utilizados en el estudio para su posterior análisis.



**Figura 6:** Diseño experimental del modelo de cáncer de pulmón con metástasis osteolíticas.

## **I.2. Línea celular y condiciones de cultivo**

Se utilizaron células humanas A549 (CCL-185), procedentes de un paciente con adenocarcinoma de pulmón y lesiones osteolíticas. Esta línea celular fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EEUU). Las células A549 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con L-Glutamina, suplementado con 1% de penicilina y estreptomicina (Invitrogen) y con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen). Esta línea celular fue autenticada mediante secuenciación y detección de mutaciones críticas en KRAS y p53.

### **I.2.1. Transducción retroviral**

La detección de la carga tumoral en los huesos de los ratones se consiguió mediante bioluminiscencia. Para ello las células utilizadas en el estudio *in vivo* tuvieron que ser previamente transducidas retroviralmente con el gen reportero de la luciferasa.

### I.2.1.1. Vectores virales.

Se utilizaron dos vectores plasmídicos para la obtención de virus portadores del gen reportero de la luciferasa:

1. El vector pSFG-Nes-TGL, cedido amablemente por el Dr. Ponomarev del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center [79]. Este vector porta los genes codificantes de GFP (para efectuar la selección de las células transfectadas con este vector) y luciferasa (para su seguimiento *in vivo*) (**Figura 7**).
2. El vector pMD.G (Addgene) que contiene genes codificantes de las proteínas de la envuelta viral.



**Figura 7:** Esquema del vector retroviral SFG-Nes-TGL que porta GFP para la selección de las células transfectadas y luciferasa para su seguimiento *in vivo*.

### I.2.1.2. Transfección de células empaquetadoras

Se transfectaron las células empaquetadoras Amphopack 293 (que contienen en su genoma los genes virales *gag*, *pol* y 4070A *env*) con los dos vectores virales explicados en la sección I.2.1.1. Para ello, se utilizó el método del cloruro cálcico:

Se mezclaron 40 µg del vector pSFG-Nes-TGL y 8 µg del vector pMD.G, en 408,2 µl de H<sub>2</sub>O filtrada; 44,9 µl de Cl<sub>2</sub>Ca 2,5M y 455 µl de tampón HEPES Salino (HBS 2X) pH 7,05. Esta mezcla se añadió gota a gota a las células empaquetadoras sembradas a un 50% de confluencia en placas p100 y con medio DMEM suplementado con 2% de FBS. Cuatro horas después se añadió DMEM con 10% de FBS y 14 horas después se añadió DMEM con de 10% FBS nuevo. Los sobrenadantes se recogieron 30, 60 y 84 horas después, se centrifugaron y filtraron con filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro (VWR International). Posteriormente,

las partículas virales se concentraron mediante ultracentrifugación (Beckman Optima™ LE-80K) a 19500 rpm, 2 horas a 12°C en un rotor Beckman Sw 32Ti. Finalmente, los virus obtenidos fueron resuspendidos en tampón fosfato salino (DPBS), se alicuotaron y guardaron a -80°C.

#### **I.2.1.3. Infección vírica de las células diana**

Se sembraron  $3 \times 10^4$  células A549 en placas de 24 pocillos y al día siguiente se infectaron con la menor cantidad de virus capaz de producir células transducidas. Se aumentó la eficiencia de la transducción con 4 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (polibreno), que aumenta la adsorción y transducción de los virus. Se mantuvo la infección durante 48 horas y a las 72 horas se inició el tratamiento con el antibiótico de selección (puromicina) durante 10 días, para eliminar las células que no tengan el gen de resistencia.

#### **I.2.1.4. Enriquecimiento y evaluación de la transducción**

Una vez transducidas, se separaron las células GFP positivas utilizando un separador de células FACSaria (Beckton Dickinson). De esta forma se consiguió aumentar el porcentaje de células GFP positivas de un 10% inicial hasta un 84%. Para verificar la funcionalidad de las células enriquecidas, éstas fueron inoculadas por vía intracardíaca a ratones atímicos y, posteriormente, se monitorizaron.

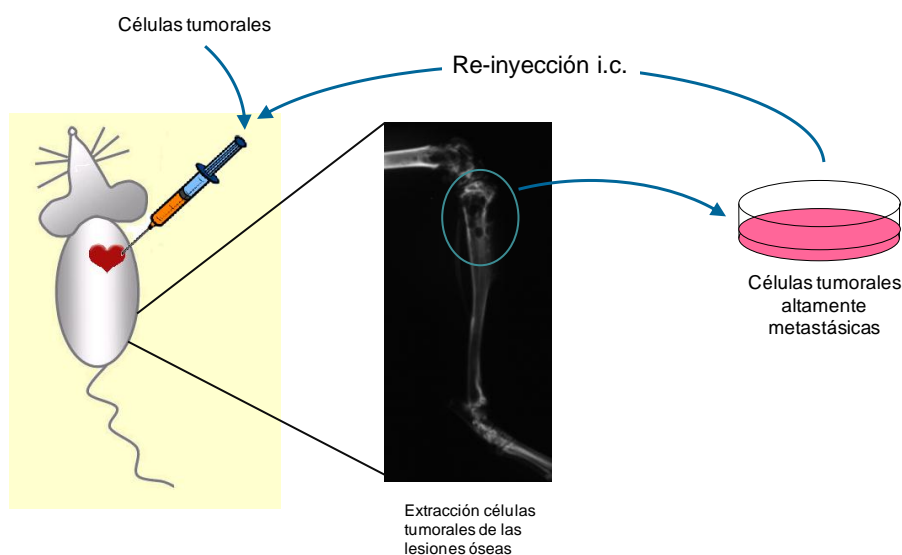
### **I.2.2. Aislamiento de células altamente metastásicas**

Para conseguir células tumorales altamente metastásicas y con tropismo específico por el hueso, se llevó a cabo el siguiente procedimiento (**Figura 8**):

Las células tumorales A549, previamente transducidas con el gen reportero de la luciferasa, fueron inoculadas a ratones atímicos desnudos, mediante punción intracardíaca, como se explicará en la siguiente sección. Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento de las células que se asentaron de forma específica en el hueso. Una vez que las células habían anidado en



el hueso (lo cual se comprobó mediante bioluminiscencia), los animales fueron sacrificados y se les extirparon las extremidades. Se cortaron ambos extremos de los huesos tras haber eliminado los tejidos blandos y la piel. Se introdujeron por la epífisis distal y atravesando la médula, 5-10mL de medio  $\alpha$ -MEM (Invitrogen) suplementado con 2x penicilina/estreptomicina con ayuda de una aguja de 27G. Las células agregadas se separaron al pasar por la aguja de 27G. Una vez liberadas de la médula, las células se cultivaron en placas de 15 cm de diámetro durante 5 días en un medio suplementado con 4mg/mL del antibiótico G-418. Las subpoblaciones de células aisladas según este protocolo, son las que fueron utilizadas en este trabajo para ser inoculadas a los ratones.



**Figura 8:** Esquema del procedimiento a seguir para el aislamiento de subpoblaciones de células altamente metastásicas y con tropismo específico por el hueso, a partir de la línea celular A549. Las células se inoculan de forma intracardíaca. Se extraen aquellas que han anidado en el hueso y se siembran.

### **I.3. Inoculación de células tumorales vía intracardíaca**

La inoculación de las células tumorales por vía intracardíaca (i.c.) se realizó con los animales anestesiados previamente con una mezcla de Xilacina y Ketamina [1:9]. Se sembraron las células a una confluencia inferior al 50%. Al día siguiente se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en PBS estéril a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL. Los ratones fueron anestesiados con Ketamina y Xilacina e inoculados con  $2 \times 10^5$  células con una viabilidad

superior al 95% en un volumen total de 100 $\mu$ L. Las células tumorales se inyectaron en el ventrículo izquierdo utilizando una aguja de calibre 29G. Para ello se colocó los ratones en *decúbito supino* y se insertó la aguja en el segundo espacio intercostal, aproximadamente 2mm a la izquierda del esternón. La entrada de sangre de color rojo brillante en la jeringa indica que estamos en el ventrículo izquierdo.

## **I.4. Preparación y administración de los fármacos**

### **I.4.1. Anestésicos**

La mezcla de Xilacina (10mg/Kg, Rompún, Parke-Davis, Pfizer) y Ketamina (100mg/kg, Ketolar, Bayer), que se utilizó en la anestesia de los animales para la inoculación de las células tumorales i.c., la realización de las pruebas de bioluminiscencia y rayos-X y la extracción de sangre, se administró vía intraperitoneal en una proporción 1:9 en un volumen final de 50 $\mu$ L de la mezcla por cada animal.

### **I.4.2. Ácido zoledrónico**

Un grupo de animales fue tratado con ácido zoledrónico (Zometa 4mg inyectable, Novartis Pharma, Basel, Suiza). Se administró una única dosis de 50  $\mu$ g/Kg (equivalente a dosis de 4mg en pacientes) 5 días después de la inoculación de las células tumorales. El ácido zoledrónico en polvo (4mg) se reconstituyó con 5mL de agua para preparaciones inyectables. Se diluyó el fármaco con suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9% p/V) hasta obtener la concentración deseada para su inyección a los animales. Dicha dosis de 50  $\mu$ g/kg fue administrada a cada ratón en un volumen final de 200  $\mu$ l vía intraperitoneal.

## **I.5. Obtención y conservación de las muestras**

Los ratones fueron sacrificados los días 7, 14, 21 y 28. El sacrificio se realizó mediante exanguinación por punción cardíaca y bajo anestesia.

La sangre extraída en el sacrificio se recogió en tubos con EDTA (Microvette®, Sarstedt, Numbrecht, Alemania) y se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, para la obtención de suero. Se hicieron alícuotas inmediatamente y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Una vez recogida la sangre, las patas posteriores de los animales se extrajeron y se eliminaron los tejidos blandos. Se fijaron durante 24 horas en formalina tamponada al 10%. Pasado este tiempo se metieron en una solución de descalcificación (Osteosoft®, Merck), para poder utilizarlos en los estudios histomorfométricos. Después de las extracciones, los ratones fueron desechados.

## **I.6. Marcadores de remodelado óseo**

### **I.6.1. Marcadores de resorción ósea**

#### **I.6.1.1. Telopéptido carboxiterminal del colágeno I**

Se determinó el telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I (CTX) en suero mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA) comercial (RatLaps™ EIA, Immunodiagnostic Systems, UK) válido para rata y ratón. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 5,6% y 10,5%; respectivamente. La sensibilidad de este ELISA es de 2ng/mL.

Se trata de un ELISA indirecto, basado en la unión competitiva de un anticuerpo policlonal al antígeno de interés, que se encuentra bien inmóvil (péptido sintético unido a la placa) o bien en forma soluble (péptido procedente de la muestra).

Se utiliza un anticuerpo primario policlonal de conejo, dirigido específicamente contra la secuencia EKSQDGGR. Esta secuencia está presente en la cadena  $\alpha 1$  del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I de rata y de ratón. Además se utiliza un anticuerpo

secundario dirigido específicamente contra el fragmento constante del anticuerpo primario, y que está conjugado con peroxidasa.

Para llevar a cabo este ELISA se emplea un péptido sintético de secuencia EKSQDGGR, que tiene que ser inmovilizado en la placa. Los pocillos de la placa están recubiertos con estreptavidina y el péptido sintético EKSQDGGR está biotinilado. Durante la preincubación, se forma un complejo estreptavidina-biotina, con lo que el péptido queda inmovilizado en la placa. Posteriormente y tras lavar los pocillos, se realiza una incubación con las muestras de suero, junto con el anticuerpo primario. Aquí es donde se produce la unión competitiva del anticuerpo primario al CTX de la muestra o al péptido sintético de la placa. Se vuelve a lavar, para eliminar todas las uniones anticuerpo-CTX soluble. A continuación, se incuba la placa con el anticuerpo secundario. Se vuelve a lavar, para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido al anticuerpo primario ligado a la placa. Por último, se revela con un sustrato cromogénico de la peroxidasa (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina o TMB). La reacción se para con ácido sulfúrico. Se mide la absorbancia a 450nm en un espectrofotómetro. La absorbancia medida será proporcional al anticuerpo secundario presente en el pocillo, es decir, inversamente proporcional a la concentración de CTX de la muestra.

#### **I.6.1.2. Isoforma 5b de la Fosfatasa ácida tartrato resistente**

Se examinaron los niveles de la Isoforma 5b de la Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR 5b) en el suero, mediante la determinación de su actividad enzimática. Se utilizó un procedimiento comercial (MouseTRAP<sup>TM</sup> Assay, Immunodiagnsotic Systems, UK), específico de ratón. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 6,5% y 8%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 0,1U/L.

Se utilizan placas pretratadas, recubiertas con anticuerpos que reconocen IgG de conejo específicamente. Se incuban con un anticuerpo policlonal que reconoce a la FATR como antígeno. Posteriormente, se lava la placa, para eliminar los anticuerpos no unidos y se incuba con las muestras a testar. Por último, se vuelve a lavar y se incuba con el sustrato cromogénico de la FATR (p-nitrofenil fosfato o pNPP) en un tampón (acetato de sodio). La reacción se para con hidróxido de sodio y se mide la absorbancia a 405nm. La intensidad del color obtenido

será directamente proporcional a la actividad y cantidad de FATR 5b presente en cada muestra.

## **I.6.2. Marcadores de formación ósea**

### **I.6.2.1. Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I**

Se determinó el Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I (PINP) en suero, mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto (competitivo) comercial (Rat/Mouse PINP EIA, Immunodiagnosic Systems, UK) válido para rata y ratón. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 7,4% y 8%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 0,7ng/mL.

El fundamento de este método es el siguiente: Se utilizan placas recubiertas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-PINP. Se añaden las muestras a la placa, junto con una solución que contiene PINP marcado con biotina. En este paso se produce una competición por unirse a los anticuerpos de la placa, entre el PINP de la muestra y el PINP marcado con biotina. Posteriormente, se lava la placa y se realiza una incubación con una enzima (HRP o peroxidasa de rábano) marcada con avidina. Se forma un complejo avidina-biotina, entre la HRP y el PINP marcado que haya conseguido unirse a los anticuerpos de la placa. Por último, se vuelve a lavar y se incuba con un sustrato cromogénico de HRP, el TMB. La reacción se para con ácido clorhídrico (HCl) y se mide la absorbancia a 450nm, tomando la absorbancia a 620nm como referencia. La intensidad del color que se obtiene, es inversamente proporcional a la concentración de PINP de la muestra.

### **I.6.2.2. Osteocalcina**

Las determinaciones de Osteocalcina (BGP) en suero se realizaron mediante un enzimoimmunoensayo (ELISA) comercial específico ratón (Osteocalcin (Mouse) ELISA, DRG Instruments, Alemania). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 6% y 8%, respectivamente. La sensibilidad de este ELISA es de 1ng/mL.

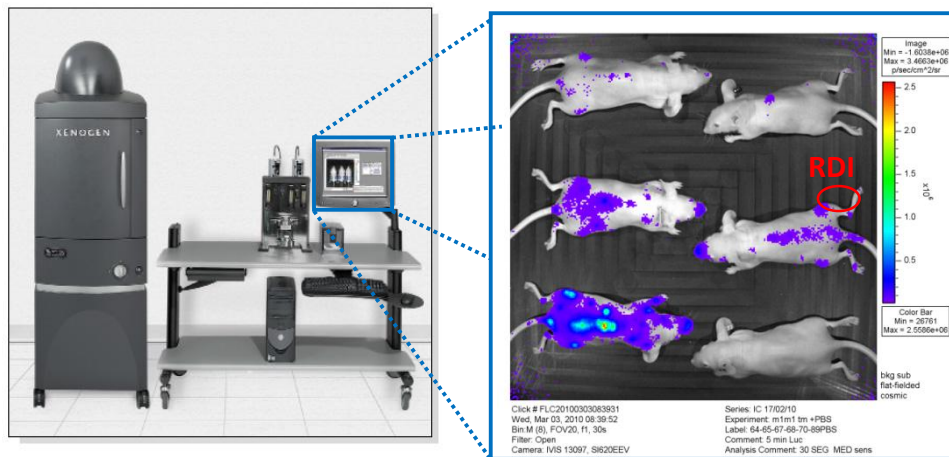
Este método es un ELISA en "sándwich". Se utiliza una placa recubierta con un anticuerpo policlonal dirigido contra la región N-terminal de BGP. Se realiza una incubación en la placa durante toda la noche de las muestras junto con un anticuerpo biotinilado específico de la región C-terminal de BGP. Una vez lavada la placa, se incuba con una peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con estreptavidina. La cantidad de osteocalcina en la muestra es detectada al añadir TMB a la placa. Se detiene la reacción añadiendo una solución que contiene ácido clorhídrico y ácido fosfórico y se mide su absorbancia a 450nm. La intensidad del color obtenido será directamente proporcional a la concentración de BGP en cada muestra.

## **I.7. Análisis de imagen**

### **I.7.1. Bioluminiscencia**

La carga tumoral se midió mediante la cuantificación de la bioluminiscencia emitida en las patas traseras de los animales, gracias a que las células inoculadas a estos ratones habían sido previamente transfectadas con el gen reportero de la luciferasa. Antes del sacrificio, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de 1,5mg de D-Luciferina (Xenogen, Alameda, CA) en 100  $\mu$ l de PBS, previamente filtrada. Se pudo determinar la presencia de las células tumorales debido a la luz que éstas emitían. La señal fue recogida exactamente a los 2 minutos de la inyección en un sistema Xenogen IVIS acoplado al software Living Image Acquisition and Analysis (Xenogen Inc.). Este sistema está formado por un dispositivo de carga acoplada (CCD) enfriado a  $-105^{\circ}\text{C}$  para minimizar el ruido de fondo y maximizar la sensibilidad. La toma de las imágenes se realizó con un campo de visión fijo a 20cm por encima de la muestra, un tiempo de exposición de 30 segundos. La sensibilidad de este aparato es de 70 fotones/s/sr/cm<sup>2</sup>.

El flujo de fotones fue calculado para cada ratón de forma independiente. Se usó una región de interés (RDI) circular que fue colocada manualmente sobre cada una de las patas traseras. El valor de fondo (obtenido de ratones inyectados con D-luciferina, pero sin células tumorales inoculadas) fue sustraído en cada una de las medidas realizadas (**Figura 9**).



**Figura 9.** Sistema Xenogen IVIS para medir bioluminiscencia

### I.7.2. Rayos X

Las radiografías fueron realizadas bajo anestesia, con los ratones colocados en *decubito prono*, sobre las placas sensibles de película radiográfica (MIN-R, Eastman Kodak). Los ratones se expusieron a una radiación-X de 20kV durante 20s, utilizando un instrumento Faxitron (Modelo MX-20, Buffalo Grove, IL, USA).

Se escanearon las imágenes a alta resolución con una magnificación 2x y capturadas a 1200ppi, utilizando un escáner Epson Expression 1680 (Long Beach, CA, EEUU). El área de osteolisis se evaluó con un sistema de análisis computarizado AnalySIS (soft imaging system GmbH, Münster, Alemania). Se delimitó manualmente el área de cada una de las lesiones osteolíticas y se sumaron, para obtener un área total de lesión ósea, en cada hueso analizado. El área de metástasis se expresó como el área total de lesiones encontradas en la tibia, con respecto al área total de dicho hueso, en cada ratón de forma independiente. Las cuantificaciones se realizaron dos veces por dos observadores independientes.

### I.7.3. Microtomografía

Para este trabajo, el total de las uniones femorotibiales se analizaron por microtomografía. Los datos se recogieron utilizando un equipo de tomografía axial computarizada de rayos X

específico para animales pequeños (microCAT™II, Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA). Este microtomógrafo adquiere la información de todo el campo de visión de una sola vez, en cada ángulo de barrido (360°). El voltaje del tubo de rayos X utilizado fue de 75,0 kVp y la corriente del mismo se fijó a 250,0μA. Los escaneos se realizaron a una resolución de 10μm.

Las imágenes longitudinales recogidas en 2D se reconstruyeron utilizando un procedimiento de proyección de deconvolución estándar con un filtro Shepp-Logan. Las imágenes fueron almacenadas en colecciones 3D para poder analizar la estructura interna desde cualquier ángulo. Para ello se utilizó un tamaño de voxel, es decir de la mínima unidad de imagen tridimensional procesable, de 19 μm x 19 μm x 23 μm.

#### **I.7.4. Histología**

##### **I.7.4.1. Tinción Hematoxilina/Eosina**

Una vez sacrificados los ratones, se extrajeron las extremidades posteriores, se eliminaron las partes blandas, se fijaron durante 24 horas en 10% formalina tamponada. Posteriormente, los huesos fueron descalcificados en solución de Osteosoft® (Merck). La inclusión de las muestras en bloques de parafina se llevó a cabo mediante la deshidratación en alcoholes de gradación creciente hasta llegar al alcohol de 100°. A continuación, se sumergieron los tejidos en xileno y, por último, en parafina. Una vez formados los bloques con la muestra incluida, se realizaron cortes de la misma de 5μm de grosor, se colocaron en portaobjetos y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina/eosina. Para realizar esta tinción se tuvieron que volver a hidratar las secciones realizadas, sumergiéndolas en alcoholes de concentraciones decrecientes hasta llegar a ser sumergidas en agua destilada. Tras la rehidratación, se incubaron los cortes 10 minutos con hematoxilina, se lavaron con agua del grifo y se tiñeron con eosina 20 segundos. Para finalizar, se volvieron a deshidratar las preparaciones, que fueron montadas utilizando una resina sintética (DPX) que conserva la tinción.



#### I.7.4.2. Determinación del número de osteoclastos

Para determinar el número de osteoclastos (células FATR+) en la interfase tumor-hueso (**Figura 10**) se llevó a cabo un análisis histoquímico utilizando Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit (Sigma-Aldrich, Barcelona, España). Este método está basado en un sustrato (Naphthol AS-BI phosphoric acid) que al ser específicamente hidrolizado por la FATR5b expresada por los osteoclastos reacciona rápidamente con una sal (Fast Garnet GBC u O-Aminoazotolueno) que ha sido previamente diazotizada utilizando nitrito de sodio. Además, a esta reacción se añade una solución que contiene tartrato-L(+), así se mide exclusivamente la actividad de la fosfatasa ácida resistente a tartrato. Como resultado de la reacción se forman unos depósitos insolubles de coloración granate, que aparecen en los sitios donde existe actividad de la enzima FATR5b específicamente.



**Figura 10.** Tinción hematoxilina eosina de hueso con metástasis. Se aprecian los osteoclastos destruyendo hueso estimulados por las células tumorales que los rodean.

Las células FATR+ multinucleadas de la interfase tumor-hueso se contaron a x400 de magnificación. Entre ocho y diez campos por hueso de cada animal fueron cuantificados. Se midió el perímetro de las lesiones tumorales. Los datos se muestran como el número de osteoclastos con respecto a la longitud de la interfase tumor-hueso.

## **I.8. Análisis de microRNA**

### **I.8.1. Aislamiento de RNA**

Se aisló el RNA total del suero de los ratones utilizando TRIzol-SL® (Invitrogen) en proporción 3:1 (TRIzol:Muestra), según el protocolo del fabricante. Después de añadir el reactivo desnaturalizante y antes de empezar el proceso de aislamiento de RNA se añadieron 3 miRNA sintéticos (25fmol/μl), para monitorizar la eficiencia de la purificación. Éstos, corresponden a tres miRNA conocidos de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39, cel-miR-54 y cel-miR-238), que fueron seleccionados porque no existen secuencias homólogas a ellos en humanos. A continuación, se añadieron 0,2mL de cloroformo por cada 0,75 mL de TRIzol. Tras agitar y centrifugar, la mezcla se separó en tres fases. La superior, más acuosa y transparente, contiene el RNA. Al tener poca cantidad de RNA en nuestras muestras, se ayudó a la precipitación añadiendo glucógeno (5-10μg). La precipitación de RNA se realizó añadiendo isopropanol. Se centrifugó y se lavó el pellet resultante con etanol 75%. Por último, se eliminó el etanol y se disolvió en agua libre de RNAsas incubando 10 minutos a 55°C.

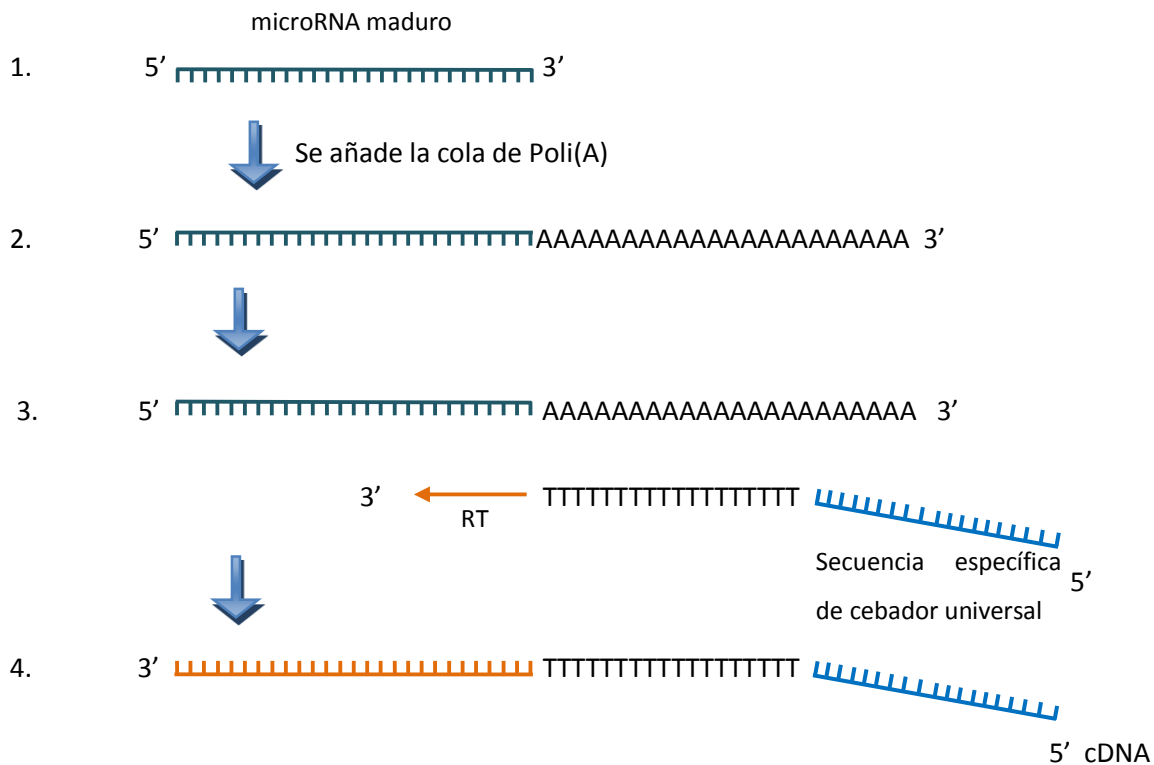
### **I.8.2. RT-PCR cuantitativa a tiempo real para análisis de miRNA**

#### **I.8.2.1. Síntesis de cDNA**

La retrotranscripción se llevó a cabo a partir del RNA extraído de nuestras muestras de suero. Se utilizó, para ello, una mezcla de 5μl de RNA de cada día y grupo de ratones. La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el kit miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR (Exiqon). Esta técnica consiste en añadir una cola de poli(A) en el extremo 3' de los miRNA maduros. Posteriormente, se realiza la retrotranscripción utilizando un cebador poli(T) con nucleótidos degenerados en 3' y una secuencia específica de un cebador universal en 5' (**Figura 11**).

El procedimiento tuvo lugar según las especificaciones del fabricante. Por cada reacción se utilizaron los siguientes reactivos: 4μl del tampón de reacción (5x), 10μl de agua libre de RNAsas, 2μl de la mezcla de enzimas y 4μl de nuestro RNA (5ng/μl). Para la retrotranscripción

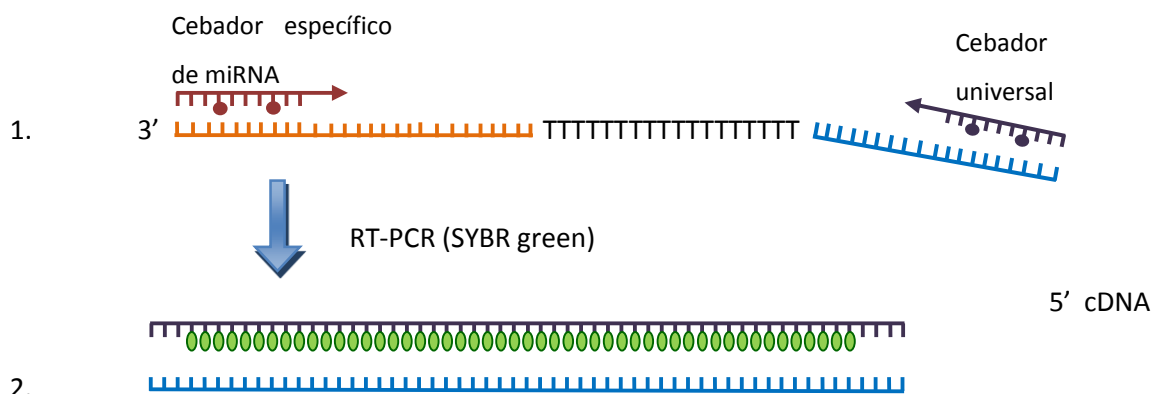
se incubó 6 minutos a 42°C, se inactivó la transcriptasa inversa con calor incubando 5 minutos a 95°C y, por último se enfriaron las mezclas a 4°C. Los cDNA obtenidos se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.



**Figura 11.** Esquema de la síntesis de miRNA mediante retrotranscripción.

### I.8.2.2. PCR a tiempo real

Para estudiar el perfil de expresión de miRNAs en suero, se utilizaron placas de 384 pocillos con cebadores de PCR “forward” para miRNA humanos prealiquotados (microRNAReady-to-use PCR Human panel I, Exiqon). Se utilizó un cebador “reverse” universal específico de la nueva secuencia añadida a los miRNA de nuestra muestra. Los cebadores utilizados, además, están contruidos con ácidos nucleicos bloqueados (En inglés, LNA o Locked Nucleic Acid), que aumentan la sensibilidad de la técnica. La cuantificación del nivel de expresión de los diferentes miRNAs se llevó a cabo como una RT-PCR mediante SYBR Green I (marca con fluorescencia las cadenas dsDNA) (**Figura 12**).



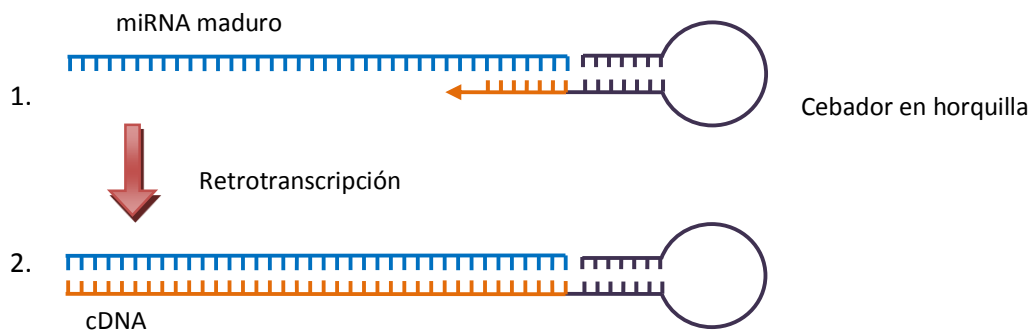
**Figura 12.** PCR a tiempo real para la cuantificación del nivel de expresión de miRNA en el suero de los ratones.

Por cada punto de estudio se realizó la siguiente mezcla: 2000µL de 2x master mix, 1980µL de agua y 20µL de cDNA. Los ciclos de incubación para que tenga lugar la RT-PCR se llevaron a cabo mediante un sistema ViiA™ 7 (Applied Biosystems) y fueron los siguientes: Activación de la polimerasa y desnaturalización (10 minutos a 95°C), y después amplificación del cDNA (45 ciclos de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C; con un incremento de la temperatura de 1,6°C/segundo). Como normalizadores se utilizaron miR-16 y miR-451.

### I.8.3. Validación de miRNA

#### I.8.3.1. Retrotranscripción

La RT-PCR específica de miRNA se realizó utilizando el kit Taqman® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), 5µL del RNA extraído del suero de los ratones a una concentración de 10ng/µL y unos cebadores específicos de miRNA (Taqman® MicroRNA assays, Applied Biosystems). Estos cebadores están diseñados en forma de horquilla ("tallo-lazo") con una pequeña parte de cadena simple complementaria al extremo 3' del miRNA, una región de cadena doble ("tallo") y el "lazo" que contiene una secuencia complementaria a un cebador universal (**Figura 13**).



**Figura 13.** Mecanismo de retrotranscripción de miRNA mediante cebadores en forma de horquilla.

Para llevar a cabo la reacción se utilizaron por cada muestra: 0,075µl de dNTP, 0,75µl de tampón 10x, 0,5µl de la enzima MultiScribeRT, 0,094µl del inhibidor de RNAsas, 1,5µl de los cebadores y 5µl de nuestro RNA (10ng/ml). Las temperaturas de incubación fueron las siguientes: 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C, 5 minutos a 85°C y por último 4°C. Los cDNA obtenidos se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

### I.8.3.2. Preamplificación del cDNA

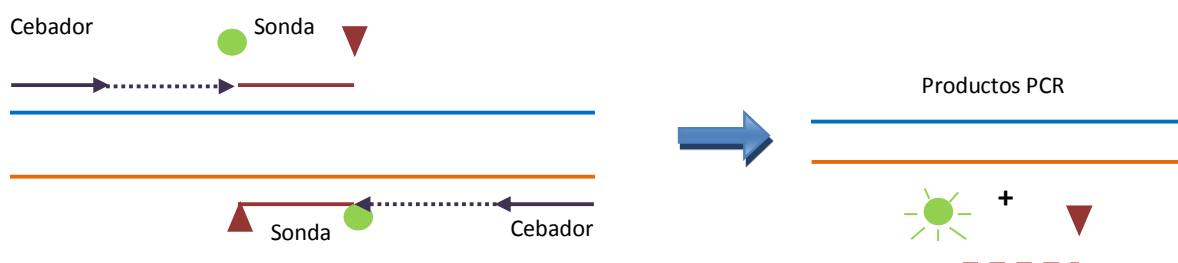
El cDNA procedente de suero necesitó un procesamiento intermedio para poder ser cuantificado. Se preamplificó realizando una PCR con el kit de preamplificación Taqman® PreAmp Master Mix kit (Applied Biosystems) que incluye Taqman® PreAmp Master Mix (2x) y Taqman® miRNA assay. Las incubaciones fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C y de 10 a 14 ciclos de desnaturalización (10 segundos a 95°C) y alineamiento y extensión (4 minutos a 60°C).

### I.8.3.3. PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó utilizando sondas TaqMan, que hibridan en un tramo interno del amplicón y que contiene un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia. Cuando la sonada está intacta, no hay emisión de fluorescencia. Para la amplificación de cDNA se utiliza además un cebador específico del miRNA que

queremos validar y otro cebador específico de la secuencia universal que se añadió durante la retrotranscripción. Durante la elongación, cuando la polimerasa llega a la región en la que se encuentra hibridada la sonda, la actividad exonucleasa de esta enzima hace que se rompa la sonda, quedando separado el fluoróforo que podrá emitir su fluorescencia. La cantidad de fluorescencia emitida, será proporcional a la cantidad de productos de amplificación de la muestra (**Figura 14**).

Los productos de la retrotranscripción se procesaron utilizando Taqman® 2x Universal PCR Master Mix (Sin amperasa UNG), TaqMan® Small RNA Assay (20x) (para los miRNA que se querían validar: miR-184, -33a, -326, -497 y -193b y para el endógeno miR-16) y 20µL de los productos de la retrotranscripción. Los tiempos de incubación fueron: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. La señal fue medida al final de cada ciclo. La expresión génica se calculó utilizando los valores de  $\Delta CT$  de cada miRNA normalizando con miR-16 y la media de los valores obtenidos de la expresión de los tres miRNA sintéticos de *C. elegans* añadidos antes de la extracción de RNA.



**Figura 14.** PCR cuantitativa mediante sondas TaqMan.

## I.9. Análisis estadístico

El estudio estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS 15.0. Las diferencias en cuanto a la bioluminiscencia y al área de metástasis fueron analizadas mediante un test paramétrico o su homólogo no paramétrico (Kruskal-Wallis), en función de la distribución de sus datos. Los valores de los marcadores de remodelado óseo se analizaron en cada punto de

corte mediante el test de Levene. Cuando el test fue positivo se aplicó el test Shapiro-Wilkson. En caso de estar distribuidos de forma normal, los datos fueron analizados mediante el test t-Student. En caso contrario se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

Se utilizó la correlación de Pearson para estudiar la relación entre bioluminiscencia, lesiones ósea, miRNAs y niveles de marcadores de remodelado óseo. Los valores se expresaron como la media $\pm$ SEM (Error estándar de la media) y se consideraron estadísticamente significativos los valores  $p<0,05$  (\*),  $p<0,01$  (\*\*) y  $p<0,001$  (\*\*\*)).

## II. ESTUDIO DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN PACIENTES

### II.1. Pacientes y diseño del estudio

#### Criterios de inclusión

Este estudio observacional, prospectivo y multicéntrico se llevó a cabo entre 2009 y 2013. Se incluyeron en el estudio las pacientes que tuvieran las siguientes características: Edad superior a 18 años, con cáncer de mama confirmado histológicamente y con metástasis óseas, esperanza de vida superior a 6 meses y con tratamientos oncológicos sistémicos estándar.

#### Criterios de exclusión

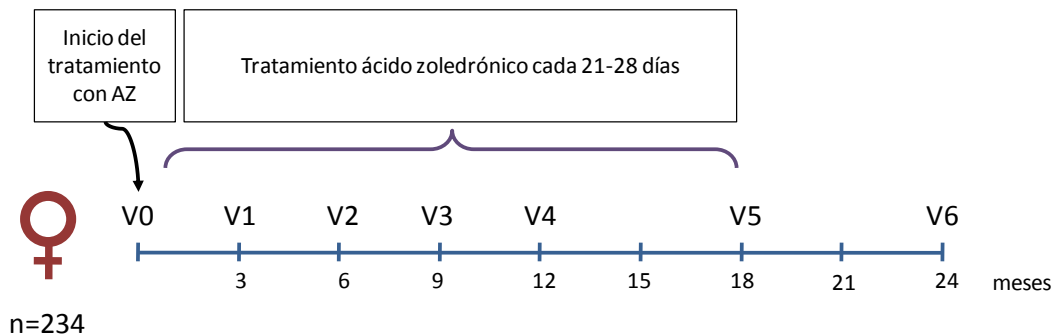
Se excluyeron del estudio aquellas pacientes que tuviesen cualquier enfermedad concomitante que pudiese interferir a la hora de evaluar los marcadores de remodelado óseo (enfermedad metabólica ósea, enfermedad de Paget, hipertiroidismo, alteraciones tiroideas, alteraciones de la absorción intestinal, alteración significativa de la función hepática y/o renal), los pacientes que hubiesen recibido tratamiento previo con bifosfonatos en los 6 meses anteriores al comienzo de estudio y los pacientes que presentaran trastornos dentales actuales y activos, incluyendo infección dental maxilar, hueso expuesto en la boca y diagnóstico actual o previo de osteonecrosis de la mandíbula.

Con estos criterios, el estudio se llevó a cabo en un total de 234 mujeres procedentes de un total de 24 hospitales de ámbito nacional. Todas las pacientes recibieron ácido zoledrónico al inicio del estudio como tratamiento para las metástasis óseas.

Este estudio se realizó de acuerdo con los principios de experimentación en humanos establecidos en la Declaración de Helsinki. Además fue aprobado por los comités éticos locales. Se recogió un consentimiento informado de cada paciente antes de entrar en el estudio.



Se realizó el seguimiento de las pacientes durante 24 meses. Durante este tiempo se realizaron 7 visitas: visita basal (V0), en el momento del comienzo del tratamiento con ácido zoledrónico, y 6 visitas de seguimiento (V1 a los 3 meses, V2 a los 6 meses, V3 a los 9 meses, V4 a los 12 meses, V5 a los 18 meses y V6 a los 24 meses) (**Figura 15**).



**Figura 15:** Diseño del estudio de mujeres con cáncer de mama y metástasis óseas

## II.2. Tratamientos recibidos

Todas las pacientes recibieron tratamiento con ácido zoledrónico (Zometa, Novartis Pharma, Basel, Suiza) como tratamiento para las metástasis óseas. Se les administró una dosis de 4mg cada 21-28 días hasta los 18 meses. El ácido zoledrónico en polvo (4mg) se reconstituyó con 5mL de agua para preparaciones inyectables. Se diluyó el fármaco con suero fisiológico (cloruro sódico al 0,9% p/V) hasta un volumen de 100ml. La solución obtenida se administró vía intravenosa. La perfusión en vena duró un mínimo de 15 minutos.

Durante el estudio, las pacientes recibieron otros tratamientos y terapias antineoplásicas. El 80,8% de ellas recibió algún tratamiento sistémico.

### **II.3. Obtención y conservación de las muestras**

Las muestras de suero y orina para las determinaciones bioquímicas se extrajeron en la visita basal y en todas las visitas de seguimiento.

Los sueros se obtuvieron a partir de aproximadamente 5ml de sangre total extraídos a cada paciente. Posteriormente la sangre se centrifugó a 1500g durante 15 minutos. El suero se separó y se repartió en alícuotas que fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

Por otro lado, se recogió la segunda orina de la mañana de cada paciente y se dividió en alícuotas. Dichas alícuotas fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

### **II.4. Determinaciones bioquímicas**

#### **II.4.1. Marcadores de remodelado óseo**

##### **II.4.1.1. Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX)**

Se determinó como marcador de resorción ósea, los fragmentos no isomerizados del telopéptido carboxiterminal del colágeno tipo I ( $\alpha\alpha$ CTX) en orina, mediante un ELISA comercial (ALPHA CrossLaps<sup>®</sup> EIA, Immunodiagnostic Systems, UK). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 2,3% y 5,3%, respectivamente. La sensibilidad de este ELISA es de 0,80ng/mL. Los valores en la población normal de este ensayo son 0,10 – 0,99 $\mu$ g/mmol de creatinina.

Este ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal altamente específico por la secuencia EKAHDGGR. Para obtener una señal positiva en este ELISA, se debe formar el siguiente complejo: 2 antígenos con la secuencia EKAHDGGR, un anticuerpo biotinilado (con especificidad por dos cadenas EKAHDGGR entrecruzadas) y un anticuerpo conjugado con la enzima peroxidasa. Este complejo se une a la estreptavidina que hay en la superficie de los

pocillos de la placa, a través del anticuerpo biotinilado. Tras una incubación a 4°C, los pocillos son lavados y se eliminan los complejos que no se hayan unido a la placa. Por último, se añade un sustrato cromogénico y se para la reacción con ácido sulfúrico. Se obtiene una coloración distinta en cada pocillo, proporcional a la concentración de  $\alpha\alpha$ CTX presente en cada muestra.

#### **II.4.1.2. Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX)**

Se determinó el marcador de resorción NTX en la orina de las pacientes, mediante un ELISA comercial (OSTEOMARK<sup>®</sup> NTx Urine, Wambole Laboratories, USA). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de este método son de 5% y 5,5%, respectivamente. La sensibilidad del método es de 1nM de equivalentes de colágeno óseo (ECO). Los valores en la población normal se encuentran entre 15 – 80nM ECO/mM de creatinina.

El método utilizado está basado en un ELISA competitivo, en cual el NTX presente en la muestra compite con el NTX adherido a la placa (placas pretratadas) por la unión a un anticuerpo monoclonal marcado con HRP. Se añade el sustrato de esta peroxidasa TMB, que al reaccionar dará mayor o menor intensidad de color al medio, en función de la concentración de NTX en la muestra. Así la cantidad de anticuerpo que quede unido a la placa, es inversamente proporcional a la cantidad de NTX presente en las muestras.

#### **II.4.1.3. Fosfatasa alcalina ósea (FAO)**

Se determinó el marcador de formación ósea, fosfatasa alcalina ósea (FAO) en suero mediante un ensayo inmunoenzimático comercial (Ostase<sup>®</sup> BAP, Immunodiagnosic Systems, UK). El método tiene una sensibilidad de 7 $\mu$ g/l. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo son de 4,5% y 6,1% respectivamente. Los valores en la población normal se encuentran en el rango 3 – 15 $\mu$ g/l.

En este ELISA se utilizan placas con pocillos recubiertos con estreptavidina. A éstos se les añaden las muestras a testar y una solución que contiene un anticuerpo monoclonal específico de FAO y marcado con biotina. Se forma un complejo: La estreptavidina se une a la biotina del anticuerpo monoclonal que a su vez se une a la FAO de la muestra. Se lavan los pocillos para

eliminar la FAO que no se haya unido a la placa y se incuban con un sustrato de esta enzima (p-NPP). El color obtenido en la placa se mide a 405nm y la absorbancia obtenida será directamente proporcional a la cantidad de FAO de la muestra.

#### **II.4.2. Creatinina**

Los niveles de creatinina en orina se midieron mediante un autoanalizador modular (Roche Diagnostics). La sensibilidad del método es de 0,1mg/dl y los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo <0,7% y <2,3%, respectivamente.

Esta determinación se llevó a cabo mediante el método de Jaffé: La creatinina en solución alcalina reacciona ácido pícrico y forma un complejo amarillo-naranja. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de creatinina y puede medirse fotométricamente.

#### **II.4.3. Células tumorales circulantes (CTC)**

La detección de las CTC se llevó a cabo mediante una técnica de enriquecimiento celular inmunomagnético (CellSearch<sup>®</sup>, Veridex LLC, USA). Este método utiliza nanopartículas con un núcleo magnético rodeado por una capa polimérica que está revestida con anticuerpos anti-EpCAM (específicos de células epiteliales). El núcleo de las células aisladas se marca mediante fluorescencia (tinción DAPI). Además se realizan otros dos marcajes, utilizando anticuerpos monoclonales específicos de leucocitos (anti-CD45-aloficocianina) y de células epiteliales (anti-citoqueratina-ficoeritrina). Mediante un cartucho magnético se separan las células epiteliales, que serán positivos para EpCAM, citoqueratina, ficoeritrina y DAPI y negativos para CD45.

Se consideran valores patológicos de CTC, aquellos que sean  $\geq 5 \text{ CTC}/7,5 \text{ ml}$  de suero.

## **II.5. Determinaciones clínicas**

### **II.5.1. Eventos relacionados con el esqueleto (EREs)**

La presencia y aparición de EREs fue determinada en la visita basal y en todas las visitas del seguimiento. Dichos eventos se definieron según los siguientes criterios: Fractura patológica, necesidad de radioterapia, necesidad de cirugía, hipercalcemia, dolor severo y compresión de la médula espinal

### **II.5.2. Progresión de la enfermedad**

La progresión de la enfermedad en las pacientes fue evaluada mediante dos herramientas: La escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) y los criterios RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*).

El primero de ellos valora la calidad de vida de los pacientes, en función de su capacidad de mantener su autonomía en la vida diaria. Esta escala se utilizó al principio del estudio (V0):

- ECOG 0: El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria.
- ECOG 1: El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque desempeña normalmente sus actividades cotidianas y trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno.
- ECOG 2: El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades personales solo.
- ECOG 3: El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo el vestirse.

- ECOG 4: El paciente permanece encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama e incluso la alimentación.
- ECOG 5: Paciente fallecido.

La escala RECIST fue evaluada a partir de la primera visita del estudio tras el comienzo del tratamiento (V1). Éste conjunto de criterios se utiliza para conocer la respuesta de los pacientes al tratamiento que están recibiendo[34]:

- Respuesta completa (RC): Desaparición de todas las lesiones.
- Respuesta parcial (RP): Disminución de la suma de los diámetros de las lesiones, de al menos un 30%, tomando como referencia la suma de los diámetros en la visita basal.
- Progresión de la enfermedad (PE): Aumento de la suma de los diámetros de las lesiones, de al menos un 20%, tomando como referencia la suma de diámetros más baja registrada a lo largo del estudio (incluyendo la visita basal). Además de este incremento relativo, se debe mostrar un aumento absoluto de al menos 5mm. Por último, la aparición de una o más lesiones es considerada como progresión de la enfermedad.
- Enfermedad estable (EE): No se observa una reducción suficiente de la suma de los diámetros de las lesiones para calificar la respuesta como RP ni un aumento suficiente como para calificarlo de PE, tomando como referencia la menor suma de diámetros recogida a lo largo del estudio.

## **II.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SAS 9.2. Los niveles de los marcadores de remodelado óseo y de las células tumorales circulantes fueron representados como la media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre los valores de los marcadores de remodelado óseo obtenidos en cada visita de seguimiento (V1-V6) y los observados en la visita

basal (V0) fueron analizadas mediante el test no paramétrico Wilcoxon. Sin embargo, las diferencias encontradas en cuanto a los niveles de células tumorales circulantes en cada visita (V1 – V6) con respecto a la visita basal (V0), se analizaron mediante el test de McNemar.

Por otro lado, se estudió el grado de correlación entre los niveles de los marcadores de remodelado óseo y de las células tumorales circulantes, mediante el coeficiente de Spearman. Se consideraron correlaciones significativas, aquellas con un valor de  $p < 0,05$ .

Se llevó a cabo el análisis de los datos mediante curvas ROC para evaluar la capacidad predictiva de los niveles de los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes para el hecho de tener eventos relacionados con el esqueleto, para la progresión de la enfermedad y para la mortalidad. Mediante estas curvas se calcularon los puntos de corte que maximizan simultáneamente la especificidad y la sensibilidad. Se consideraron variables con capacidad de pronóstico aceptable cuando el área bajo la curva es  $\geq 0,7$ .

Se construyeron las curvas ROC con los siguientes parámetros:

1. Con los valores de los niveles basales de los biomarcadores.
2. Con los cambios en los niveles de los biomarcadores en la visita 1 con respecto a la visita basal (definidos como marcador en V1/marcador en V0).

Se construyeron curvas de supervivencia Kaplan-Meier para evaluar si los marcadores se asocian con el tiempo desde el comienzo del tratamiento y la aparición de EREs, la progresión de la enfermedad o la muerte. Se calcularon dichas curvas de acuerdo con cuatro clasificaciones:

1. Niveles basales de biomarcador “mayor que” (patológico) o “igual o menor que” el límite superior de normalidad de dicho marcador.
2. Niveles basales de biomarcador “mayor que” o “igual o menor que” el punto de corte obtenido en las curvas ROC de los valores basales.

3. Marcador en V1/marcador en V0 “mayor que” o “igual o menor que” el punto de corte obtenido en la curva ROC correspondiente.
4. Niveles de marcador normales o no normales (patológicos) en la V1.

En cada gráfico se llevaron a cabo las comparaciones de las curvas usando el test log-rank, representado como el valor p.

Se utilizaron modelos de regresión de Cox univariantes para cuantificar el grado de asociación (capacidad de predicción) de los distintos marcadores y la aparición de EREs, la progresión o la muerte. Mediante este modelo se calculó el *Hazard ratio* (HR; indicador de cuántas veces mayor es el riesgo de que ocurra un evento en un grupo con respecto a otro), el error estándar y un intervalo de confianza del 95% para el HR. Además se calculó el p valor para contrastar la hipótesis del valor de HR calculado. Se estimaron las magnitudes de los HR de tal forma que el estudio tuviese un poder estadístico del 80%, que fueron de 2,0 y 1,8 para la mortalidad y la progresión de la enfermedad, respectivamente. Estos datos fueron calculados basándonos en las incidencias acumuladas de muerte (60%) y progresión de la enfermedad (80%). Además, para este cálculo, se utilizó el tamaño muestral de cada uno de los grupos comparados, que fue diferente en algunas de las variables estudiadas. La peor situación encontrada (sólo un 10% de los pacientes en uno de los grupos) fue la que se utilizó para calcular el poder estadístico.





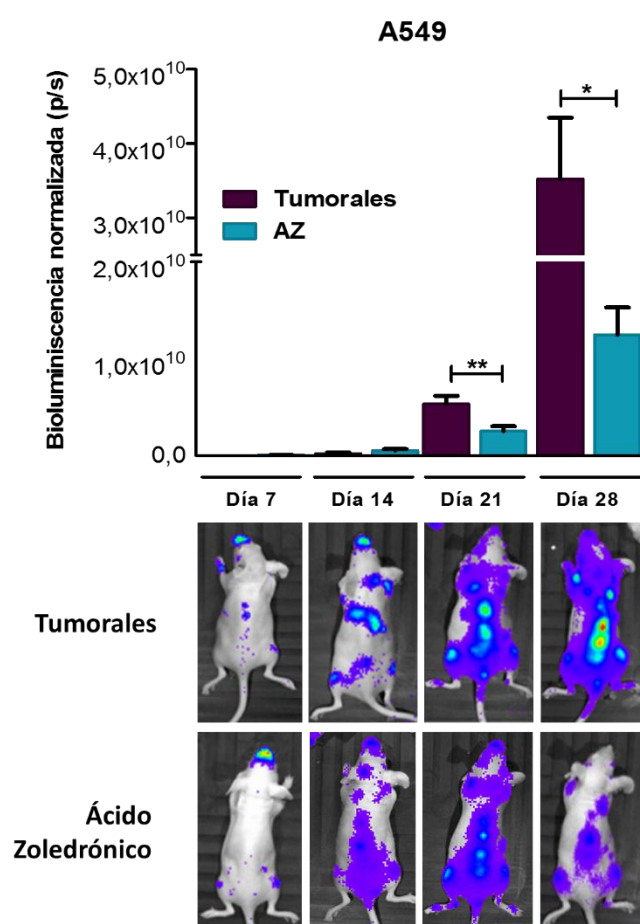


## I. ESTUDIO EN MODELO DE RATÓN CON METÁSTASIS ÓSEAS

### I.1. Caracterización del modelo animal mediante métodos de imagen

#### I.1.1. Cuantificación de la carga tumoral en los huesos

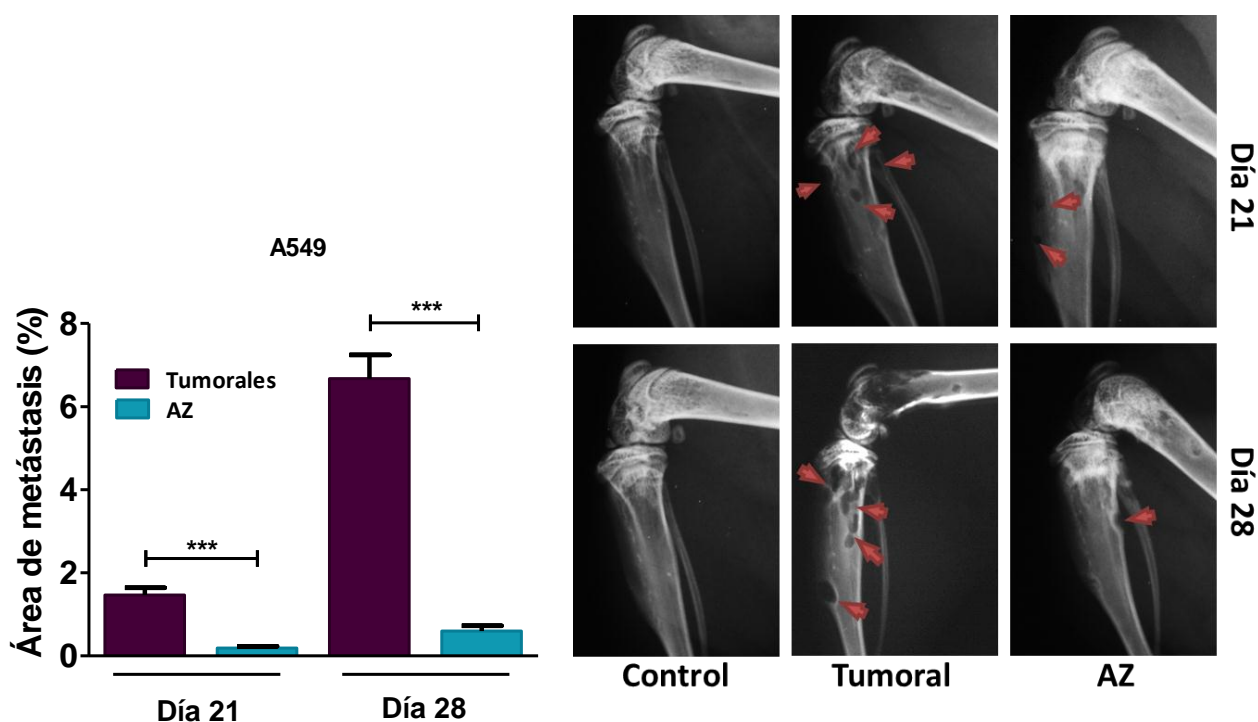
Los datos obtenidos mostraron un aumento progresivo de la carga tumoral a lo largo de los días en el hueso de los ratones inoculados con las células tumorales A549, significativamente mayor semana tras semana. Esto ocurrió en el grupo tratado y en el grupo sin tratar con ácido zoledrónico. Esto demuestra que las células utilizadas tienen tropismo específico por el hueso. Por otro lado, al comparar estos dos grupos, se observó que la carga tumoral era significativamente menor en los ratones que recibieron tratamiento que en los ratones tumorales sin tratar. Dichos resultados fueron observados a partir del día 14 desde la inoculación de las células tumorales hasta el final del estudio (**Figura 16**).



**Figura 16.** Carga tumoral medida por bioluminiscencia en los ratones atímicos desnudos inoculados con células A549 (tumorales) e inoculados con las células tumorales y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medida a los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Datos representados como la media±SEM. Significación estadística  $p<0,05(*)$  y  $p<0,01(**)$  utilizado la prueba U de Mann-Whitney.

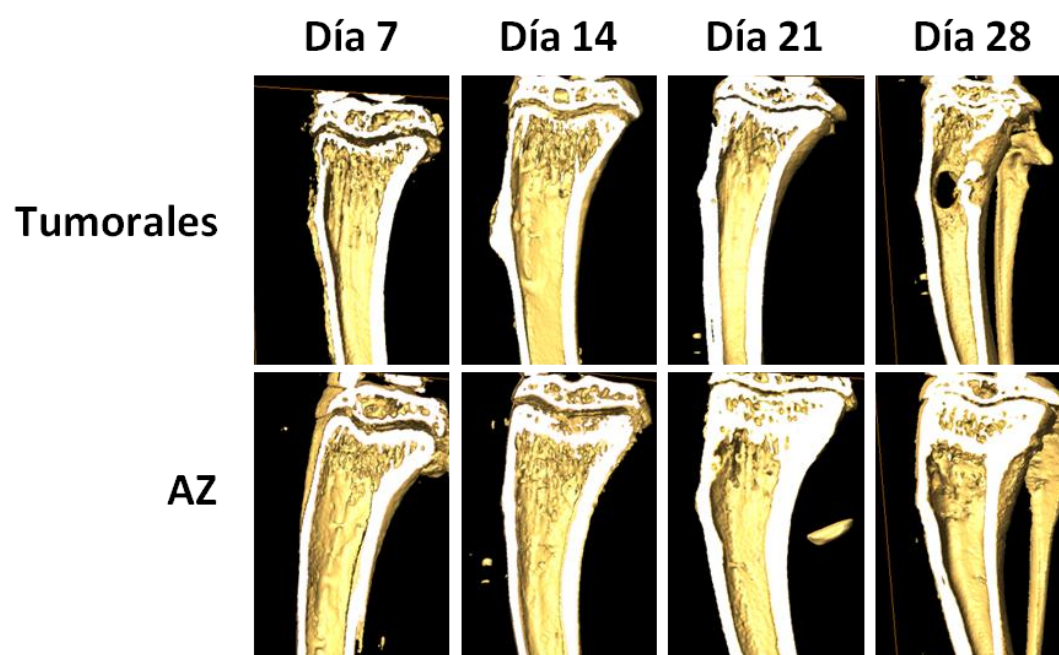
### I.1.2. Actividad osteolítica de las células tumorales

Para comprobar que el modelo animal utilizado producía metástasis osteolíticas, se realizaron radiografías de las uniones femorotibiales de todos los animales estudiados. Se cuantificó el área de las metástasis y el área total de hueso. Con estos valores se calculó el cociente Área de metástasis/Área de hueso total, para normalizar la extensión de las lesiones óseas. Los resultados obtenidos mostraron desde el día 21, un área de metástasis significativamente menor en el grupo de ratones tratado con ácido zoledrónico que en el grupo sin tratar. Además entre el día 21 y el día 28 se observó un aumento significativo de más de tres veces en el área de osteolisis del grupo tumoral no tratado. No se muestran los datos de los días 7 y 14 ya que no se observó aparición de lesiones osteolíticas hasta el día 21 (**Figura 17**).



**Figura 17.** Extensión de las lesiones osteolíticas medida por rayos-X de ratones atímicos desnudos sanos, inoculados con células A549 (tumorales) e inoculados con células A549 y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medidos a los días 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Significación estadística  $P < 0,0001$  (\*\*\*) utilizando el test T de Student.

Con el fin de complementar el análisis de los huesos realizado mediante rayos X, se llevó a cabo un estudio utilizando  $\mu$ TC (**Figura 18**). Cuando analizamos las imágenes de los huesos del día 28, se observa ruptura y deformación de la región cortical, además de aparición de lesiones metastásicas. Dichas deformaciones no se observaron en los huesos de los ratones tratados con ácido zoledrónico. En ellos, a partir del día 14, se observó que, debido al tratamiento, se producía un aumento progresivo de la región osteoformadora. Además, a días 21 y 28, en estos ratones, se observa un aumento del grosor trabecular y de la región cortical.



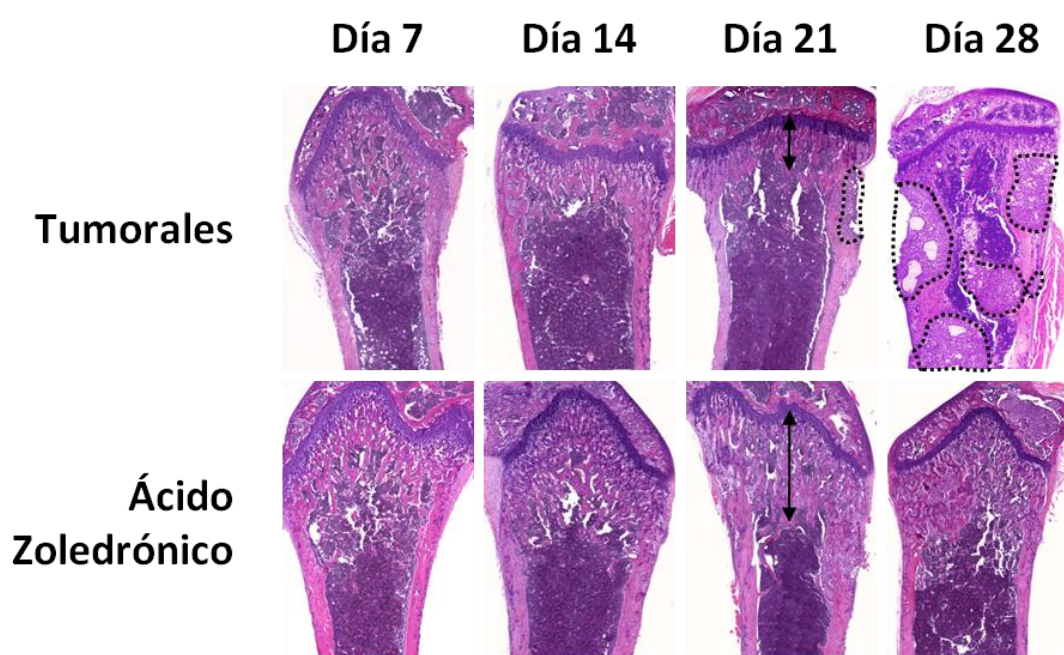
**Figura 18.** Microestructura, analizada por microtomografía computarizada, de los huesos de los ratones inoculados con células tumorales A549 sin tratar (Tumores) e inoculados con las células tumorales y tratados con ácido zoledrónico (AZ), a los días 7, 14, 21 y 28.

### I.1.3. Análisis histológico de los huesos

Con respecto a la histología de los huesos de los ratones (**Figura 19**), no se observaron diferencias entre grupos ni en el día 7 ni en el 14. Sin embargo, en el grupo tumoral no tratado, a partir del día 21 las células tumorales empiezan a invadir la región cortical, descendiendo el espesor de la región trabecular que hay por debajo del cartílago de crecimiento y se produce una deformación metafisaria. Cuando observamos los cortes del grupo tumoral a día 28, se

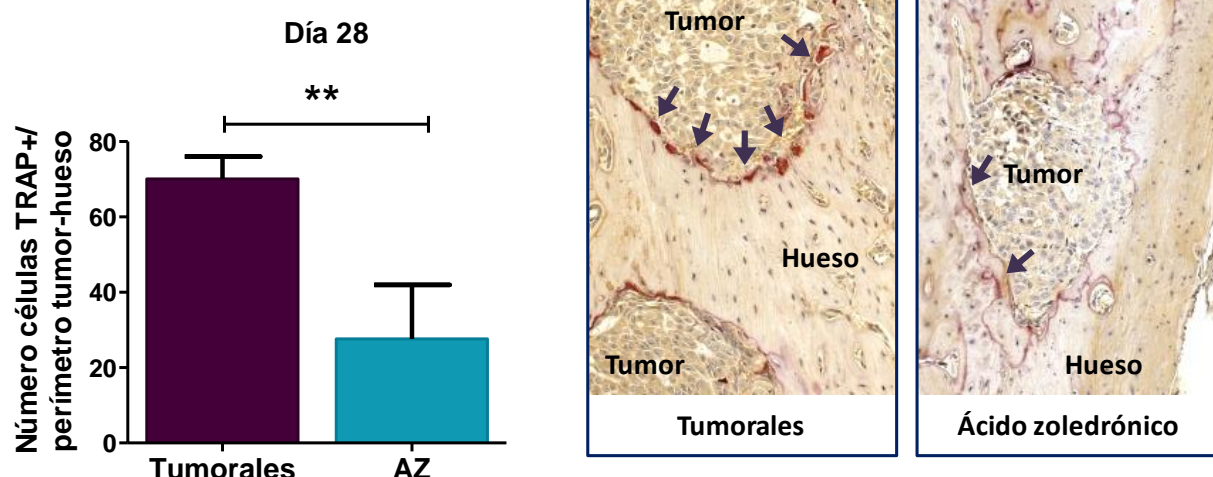
puede ver que el tumor ha invadido prácticamente la totalidad de la médula ósea y que la región cortical ha desaparecido, así como las trabéculas que hay por debajo del cartílago de crecimiento.

Sin embargo, es importante señalar que el tratamiento con ácido zoledrónico evita la anidación de las células tumorales en el hueso. En los huesos de los ratones tratados se puede observar el efecto antirresortivo del tratamiento, ya que desde el día 14 se puede ver cómo ha aumentado la extensión de la zona osteoformatora.



**Figura 19.** Histología de los huesos de los ratones inoculados con células tumorales A549 sin tratar (Tumores) e inoculados con las células tumorales y tratados con ácido zoledrónico (Zoledrónico), los días 7, 14, 21 y 28. Las flechas muestran el espesor de la región osteoformatora. Las zonas delimitadas con líneas de puntos corresponden a las áreas de hueso invadidas por células tumorales.

Se pudo comprobar mediante tinción FATR de los cortes histológicos de los huesos de los ratones (**Figura 20**), que la interfase tumor-hueso se caracterizaba por estar compuesta de células FATR+, es decir, osteoclastos. Cuando se trató a los animales con el antirresortivo ácido zoledrónico, el número de estas células multinucleadas disminuyó significativamente.



**Figura 20.** Número de células FATR+ presentes en la interfase tumor-hueso. Significación estadística  $p < 0,05$  (\*\*) utilizando el test T de Student. A la derecha se muestran imágenes representativas de la tinción FATR de las tibias de los ratones inoculados con células tumorales A549 sin tratar (Tumorales) e inoculados con las células tumorales y tratados con ácido zoledrónico (AZ). Las flechas señalan las células FATR+ (osteoclastos) de la interfase tumor-hueso.

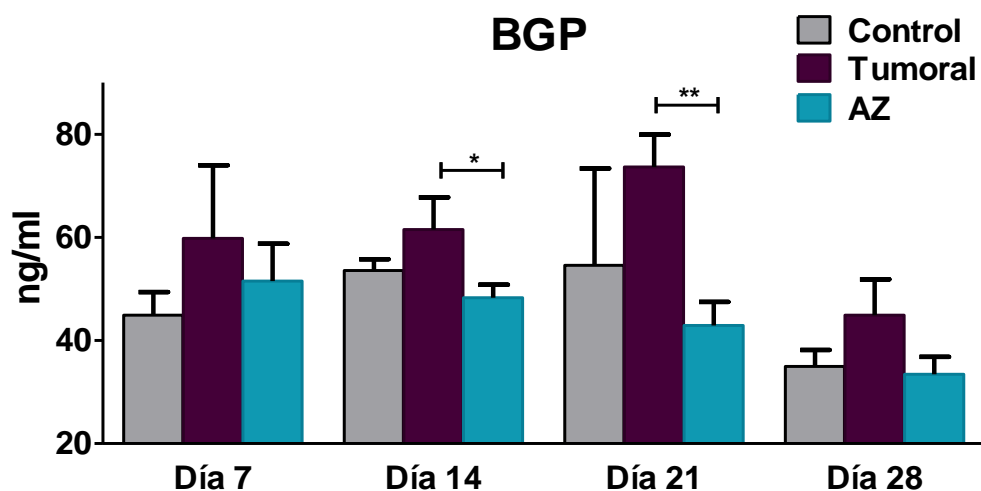
## I.2. Estudio de los niveles de los marcadores de remodelado óseo.

### I.2.1. Marcadores de formación: BGP y PINP

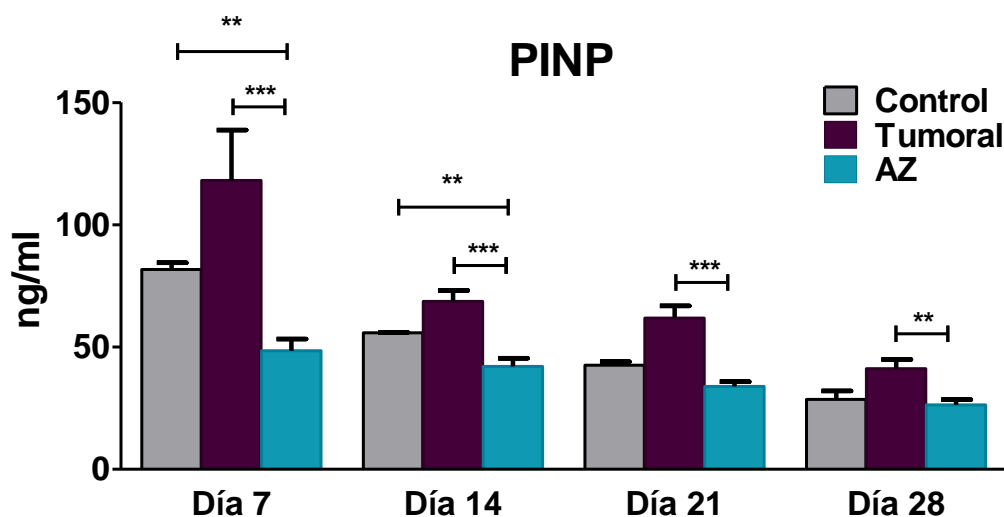
Se observó una tendencia al aumento de los niveles de osteocalcina en suero en el grupo tumoral comparado con el grupo sano, en todos los tiempos analizados. El tratamiento con ácido zoledrónico hizo que dichos niveles disminuyeran, llegando a ser similares a los valores de osteocalcina en los ratones control (**Figura 21**).

Al medir el propéptido aminoterminal del procolágeno I en el suero de los ratones, se observó, desde la primera semana, una tendencia a que los niveles fueran más elevados en el grupo tumoral que en el grupo control. Además los ratones que recibieron el tratamiento presentaron valores de PINP significativamente menores que los del grupo tumoral, llegando a ser incluso significativamente menores que los de los controles en las dos primeras semanas del estudio (**Figura 22**).





**Figura 21.** Niveles de osteocalcina (BGP) en el suero de ratones atímicos desnudos sanos (Control), inoculados con células A549 (Tumoral) e inoculado con células A549 y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medidos a los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Significación estadística \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , utilizando el test T de Student.

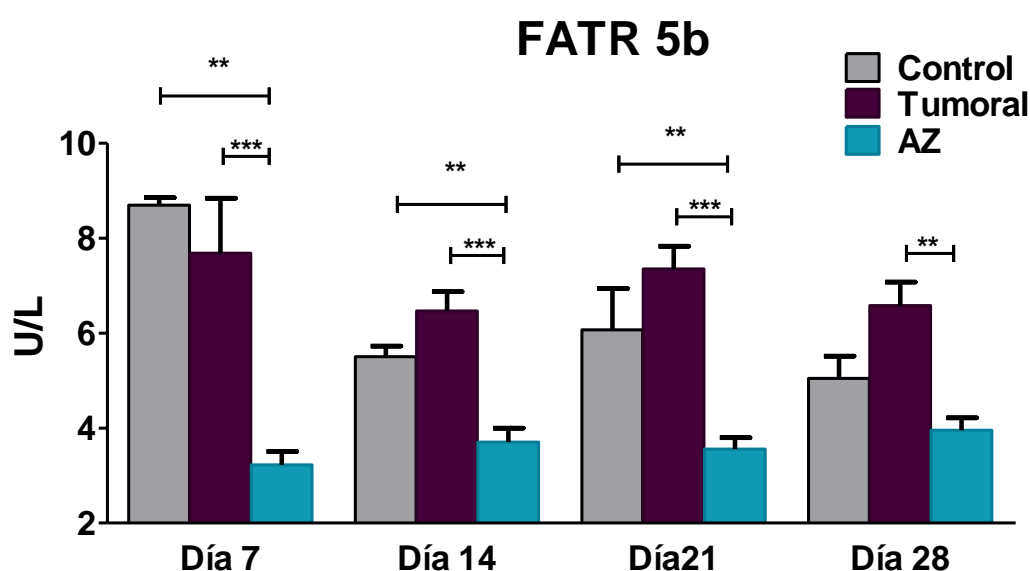


**Figura 22.** Niveles de Propéptido aminoterminal del procolágeno I (PINP) en el suero de ratones atímicos desnudos sanos (Control), inoculados con células A549 (Tumoral) e inoculado con células A549 y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medidos a los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Significación estadística \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando el test T de Student.



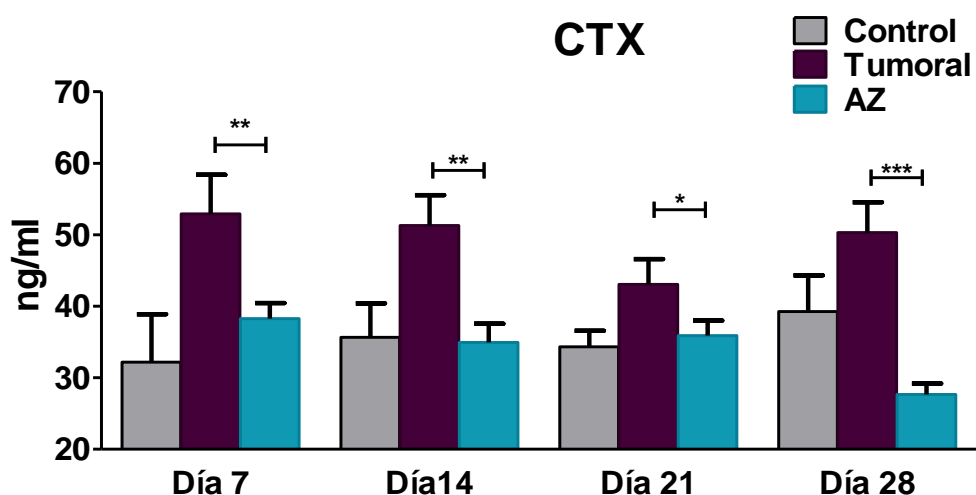
### I.2.2. Marcadores de resorción: FATR 5b y CTX

Se observó una tendencia a la elevación de los niveles de fosfatasa ácida tartrato resistente en el grupo tumoral, a partir de la segunda semana del estudio. Estos niveles se redujeron significativamente tras el tratamiento con ácido zoledrónico, siendo incluso más bajos que los niveles observados en el grupo de ratones sanos, desde el principio del estudio (**Figura 23**). Estos resultados concuerdan con los encontrados al realizar la tinción FATR en los cortes histológicos.



**Figura 23.** Niveles de Fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR 5b) en el suero de ratones atímicos desnudos sanos (Control), inoculados con células A549 (Tumoral) e inoculado con células A549 y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medidos a los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Significación estadística \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando el test T de Student.

Siete días tras la inoculación de las células tumorales se observó también una tendencia a la elevación de los niveles telopéptido carboxiterminal del colágeno I en suero, en el grupo de ratones inoculados sin tratar. Dichos niveles se redujeron significativamente cuando se trató a los animales con ácido zoledrónico, 28 días tras la inoculación de las células tumorales A549 (**Figura 24**).



**Figura 24.** Niveles de Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX) en el suero de ratones atímicos desnudos sanos (Control), inoculados con células A549 (tumoraes) e inoculado con células A549 y tratados con ácido zoledrónico (AZ); medidos a los días 7, 14, 21 y 28 tras la inoculación de las células tumorales. Significación estadística \* $p < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , utilizando el test T de Student.

### **I.3. Correlación entre los marcadores y las técnicas de imagen**

Al analizar todos los datos obtenidos en conjunto, pudimos observar que a día 21 todos los marcadores de remodelado óseo se correlacionaban con la extensión de las lesiones osteolíticas medidas por rayos-X. De los cuatro marcadores el que mejor correlación mostró fue la fosfatasa ácida tartrato resistente (FATR5b). Además en este punto del estudio se observó que la carga tumoral, cuantificada por bioluminiscencia, se correlacionaba con los dos marcadores de resorción analizados (**Tabla 4**).

Por otro lado, los datos obtenidos en el día 28 del estudio, no mostraron correlación entre ninguno de los marcadores de remodelado óseo y bioluminiscencia, debido probablemente a los valores extremos de carga tumoral obtenidos. Sin embargo, a día 28, sí se observó correlación entre la extensión de las lesiones osteolíticas y los dos marcadores de resorción ósea cuantificados (CTX y FATR 5b) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación entre marcadores de remodelado óseo y técnicas de imagen 21 ó 28 días después de la inoculación de las células A549.

	Día 21		Día 28	
	Bioluminiscencia	Rayos X	Bioluminiscencia	Rayos X
<b>PINP</b>	ns	0,6267**	ns	ns
<b>BGP</b>	ns	0,6162**	ns	ns
<b>CTX</b>	0,5046*	0,5886**	ns	0,8254***
<b>FATR5b</b>	0,4928*	0,7846***	ns	0,6864**

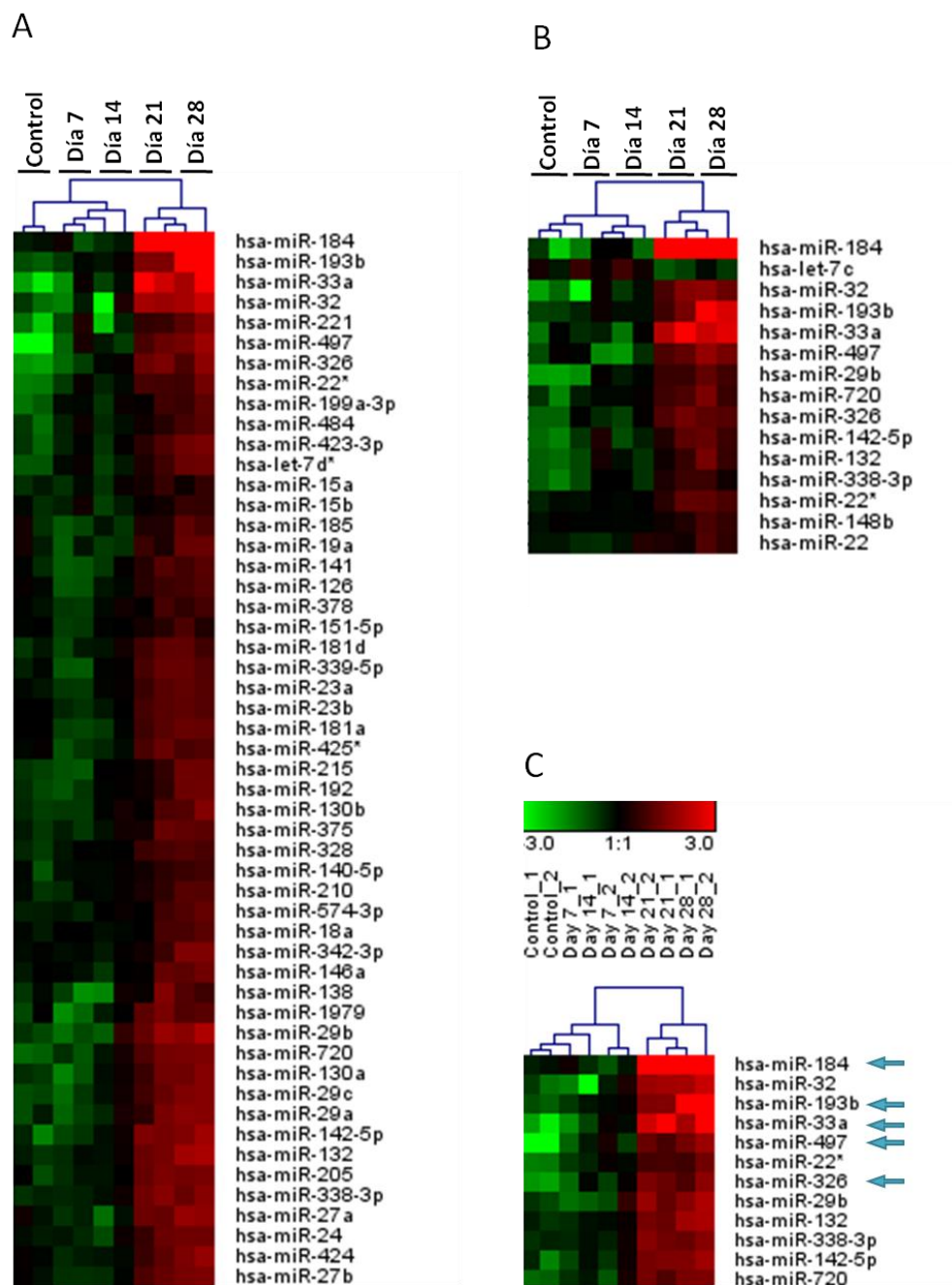
ns: No significativo; \* $p > 0,05$ ; \*\* $p > 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$

#### **I.4. Identificación transcriptómica de microRNAs.**

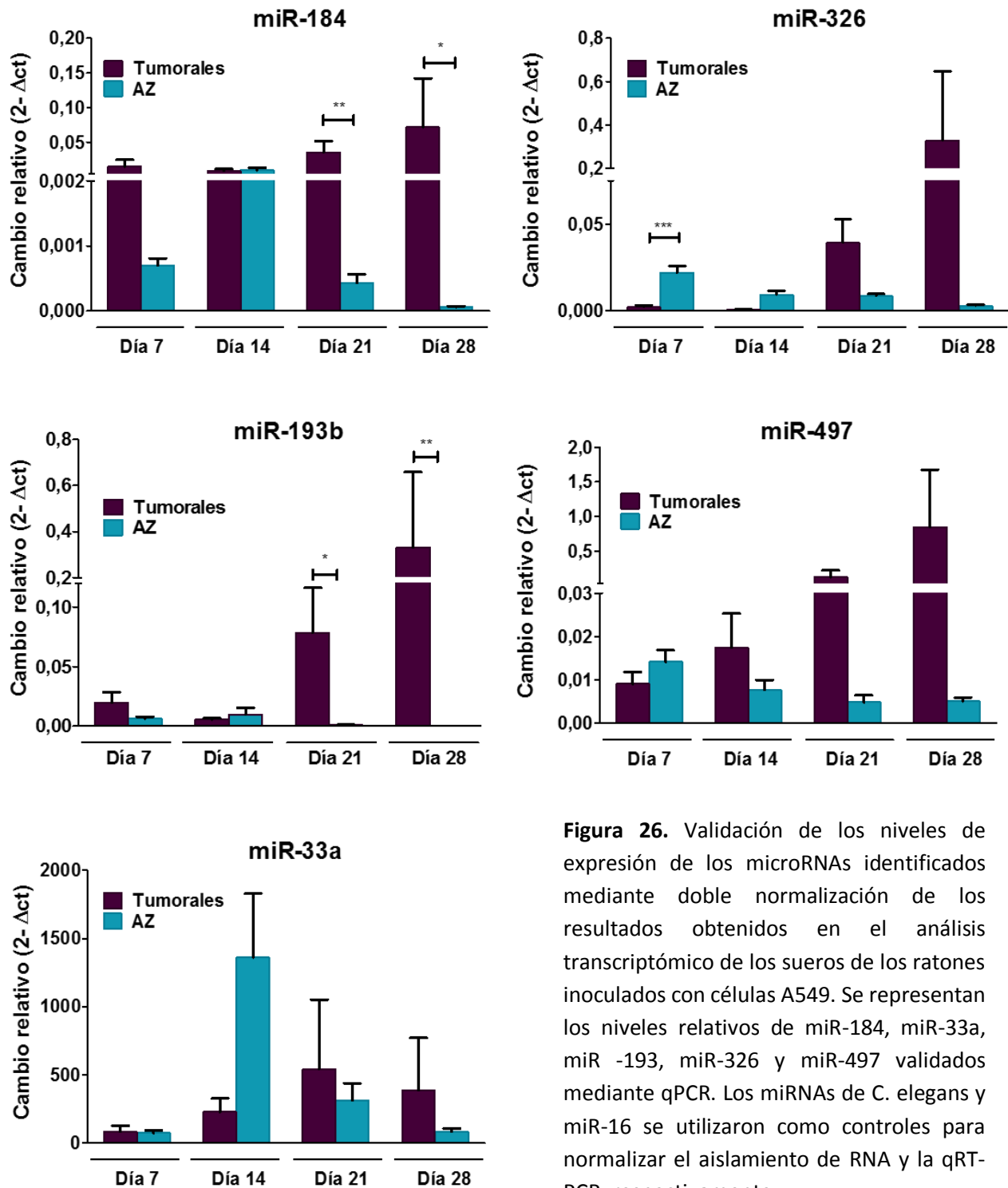
Se analizó la expresión de 380 microRNAs en el suero de los ratones tumorales en los distintos días de estudio. Los miRNAs analizados fueron seleccionados por encontrarse generalmente expresados de forma diferencial en ciertas enfermedades o por estar citados frecuentemente en la literatura. Se llevó a cabo una doble normalización. En primer lugar, la normalización con miR-16 permitió identificar en el suero de los ratones tumorales, 54 miRNAs expresados de forma diferencial (**Figura 25A**), mientras que la normalización con miR-451 permitió la identificación de 15 miRNAs (**Figura 25B**). Al realizar el cruce de los resultados para la doble normalización, se encontró un perfil de expresión de 12 miRNAs expresados de distinta forma en el suero de los ratones tumorales con respecto a la expresión de los ratones control (**Figura 25C**).

Las diferencias de expresión de los miRNAs identificados pueden ser debidas al aumento de la carga tumoral y a la interacción entre las células tumorales y las células de su entorno, por ello sólo se seleccionaron aquellos miRNAs que mostraron un aumento de su expresión a lo largo del tiempo. Se excluyeron aquellos cuya expresión disminuía en algún momento del experimento o que mostraron resultados inconsistentes entre dos puntos consecutivos en el tiempo. De esta forma, al final se realizó la validación de miR-184, -193b, -326, -33a y -497 (**Figura 26**). Esta validación mostró un descenso de los niveles de expresión de los miRNAs en

el grupo de ratones tratados con ácido zoledrónico, de todos los microRNAs seleccionados, con excepción de miR-184 y miR-33a.



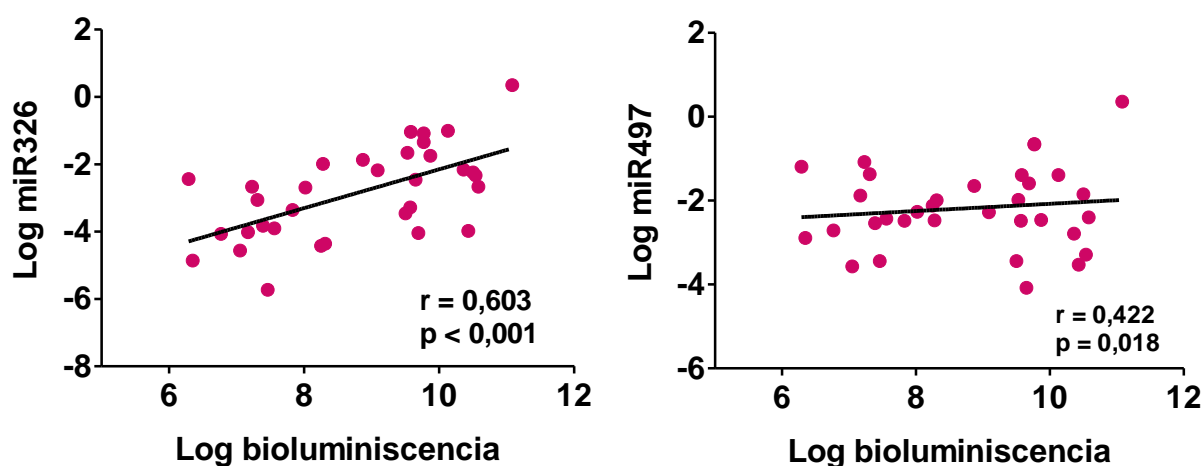
**Figura 25.** Perfil de expresión de microRNAs expresados en el suero de los ratones inoculados i.c. con células A549. A) Análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los perfiles de expresión de los microRNAs detectados en el suero de los ratones sanos o tumorales, normalizado con miR-16. Sólo se representan los miRNAs con diferencias de expresión significativas. Cada fila representa un único miRNA. Los resultados de expresión de cada día se representan en columnas. B) Análisis de agrupamiento jerárquico de los perfiles de expresión de los microRNAs en suero tras la normalización con miR-451. C) Lista de miRNAs comunes a las dos normalizaciones.



**Figura 26.** Validación de los niveles de expresión de los microRNAs identificados mediante doble normalización de los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico de los sueros de los ratones inoculados con células A549. Se representan los niveles relativos de miR-184, miR-33a, miR -193, miR-326 y miR-497 validados mediante qPCR. Los miRNAs de *C. elegans* y miR-16 se utilizaron como controles para normalizar el aislamiento de RNA y la qRT-PCR, respectivamente.

### I.5. Correlación entre los miRNAs y las técnicas de imagen.

Se analizó de la correlación entre los microRNAs identificados y validados y los parámetros medidos mediante técnicas de imagen: carga tumoral (bioluminiscencia) y extensión de las metástasis osteolíticas (rayos X). Se encontró una fuerte correlación entre miR-326 y la bioluminiscencia de los ratones tumorales ( $r=0,603$ ;  $p<0,001$ ). MiR-497 mostró una correlación más débil aunque significativa con respecto a la bioluminiscencia ( $r=0,422$ ;  $p<0,018$ ) (Figura 27).



**Figura 27.** Correlación entre bioluminiscencia y los microRNAs miR-326 ( $r=0,603$ ;  $p<0,01$ ) y miR-497 ( $r=0,422$ ;  $p=0,018$ ) calculadas mediante la asociación de Pearson, en el modelo de ratones inoculados con las células A549 y con metástasis óseas.

No se encontraron correlaciones significativas entre los microRNAs estudiados y la extensión de las metástasis medida mediante rayos X. Tampoco se observaron correlaciones en el grupo de ratones tratados con ácido zoledrónico.

## II. ESTUDIO DE LAS METÁSTASIS ÓSEAS EN PACIENTES

### II.1. Características basales de las pacientes

La **tabla 5** muestra las características basales de las 234 pacientes incluidas en este estudio. Durante el tiempo que duró este trabajo, 73 pacientes abandonaron el estudio (31,2%): 2 anularon sus consentimientos informados, 11 consentimientos se perdieron durante el seguimiento, 3 pacientes fueron excluidas por criterios de los investigadores, 29 dejaron el tratamiento con bifosfonatos durante más de 2 visitas, 2 presentaron un empeoramiento de la enfermedad, 1 fue trasladado a otro centro, 1 fue hospitalizado con frecuencia, 1 tenía insuficiencia renal y 1 por mal estado de salud. Además durante este período 50 pacientes murieron (21,4%).

### II.2. Evolución de la enfermedad.

#### II.2.1. Aparición de eventos relacionados con el esqueleto (EREs).

Se observó un descenso del porcentaje de pacientes que desarrollaron nuevos eventos relacionados con el esqueleto en las sucesivas visitas del estudio. Este descenso fue progresivo desde la V0 a la segunda visita tras el inicio del tratamiento (**Figura 30**). A partir de la V2, no se observaron cambios en cuanto al porcentaje de pacientes que desarrollaba nuevos EREs.

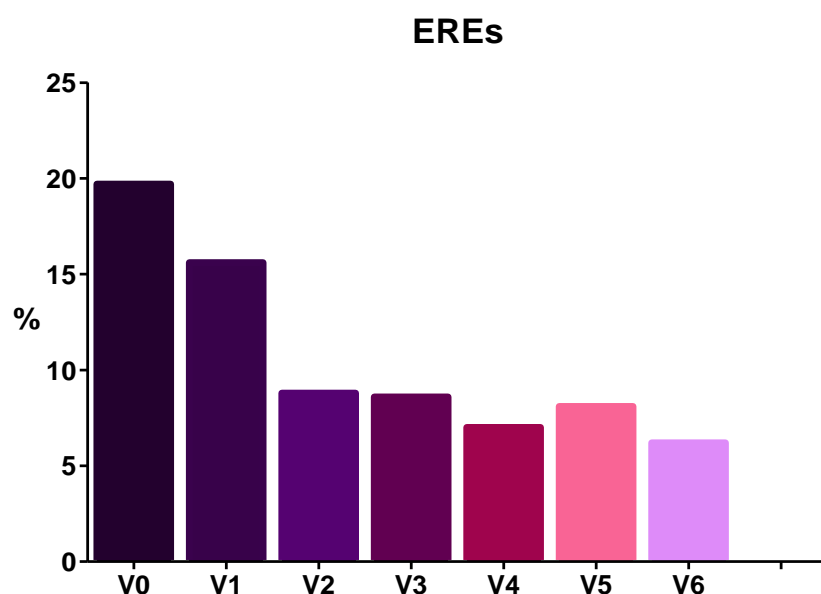
#### II.2.2. Estudio de la progresión de la enfermedad.

Se registró un aumento del porcentaje de pacientes en los cuales la enfermedad progresó de acuerdo con los criterios RECIST, a pesar del tratamiento con ácido zoledrónico. Esta proporción de pacientes con progresión de la enfermedad pasó de ser un 15,4% en la V1 a un

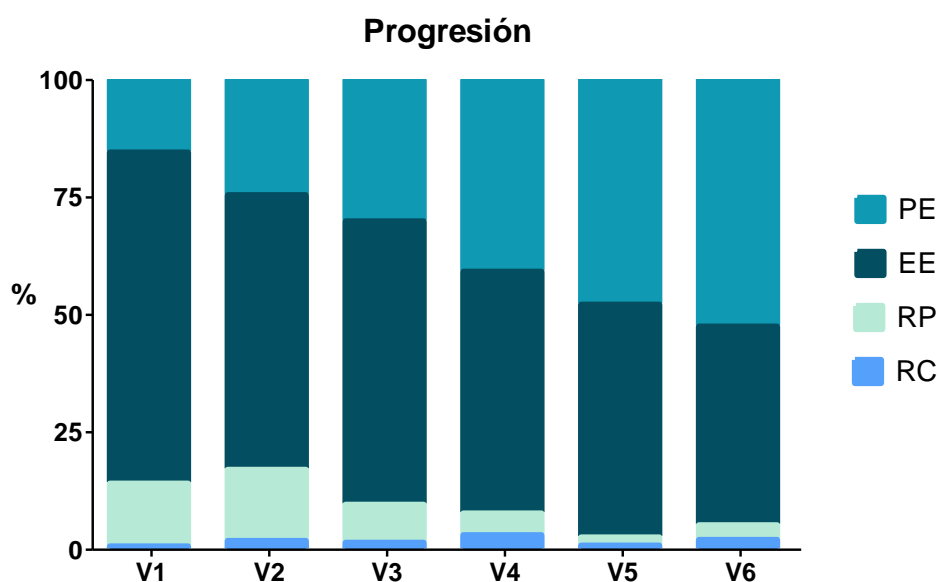
52,6% en la V6. Por otro lado, el porcentaje de pacientes con respuesta parcial disminuyó de un 13.4% en V1 a un 3.1% en V6 (**Figura 31**).

<b>Tabla 5. Características basales de las pacientes</b>	<b>N = 234</b>
Edad, (años) media $\pm$ DE	59,8 $\pm$ 13,3
Postmenopáusicas, N (%)	187 (82,4)
Estado de los receptores	
Receptor de estrógenos (RE) positivo, %	80,3
Receptor de progesterona (RP) positivo, %	64,9
Sobre expresión del oncogen HER2/neu, %	18,3
Estado funcional ECOG, N (%)	
1	102 (55,7)
2	69 (37,7)
3	12 (6,6)
Localización de las metástasis, N (%)	
Sólo en hueso	121 (51,7)
Hueso y otras vísceras	79 (33,8)
Hueso y otros tipos	34 (14,5)
Tiempo desde el diagnóstico del cáncer de mama, (años) media $\pm$ DE	6,6 $\pm$ 6,3
Tiempo desde el diagnósticos de las metástasis óseas, (meses) media $\pm$ DE	8,2 $\pm$ 18,5
EREs previos al estudio, N (%)	46 (19,7)
Tratamiento sistémico del cáncer de mama, N (%)	189 (80,8)
Quimioterapia	148 (78,3)
Hormonoterapia	117 (61,9)





**Figura 30.** Porcentaje de pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días) desde el comienzo del estudio, que muestran aparición de nuevos eventos relacionados con el esqueleto en cada una de las visitas del estudio.

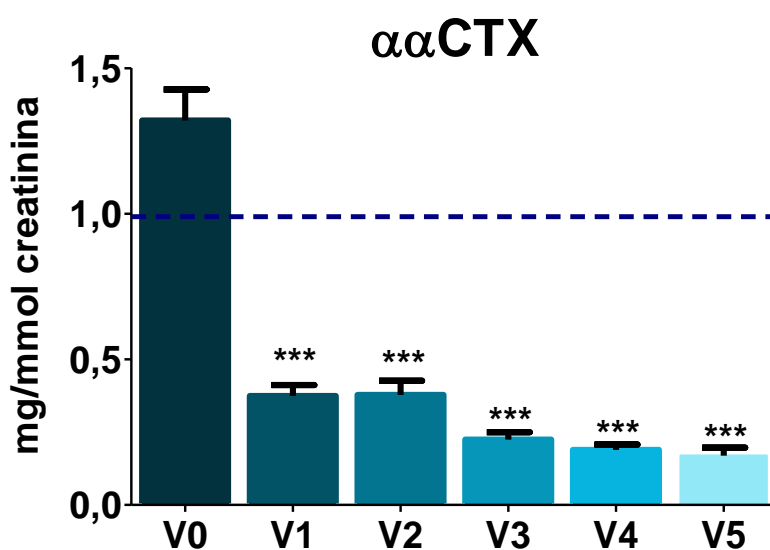


**Figura 31.** Porcentaje de pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas tratadas con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días) que presentan progresión de la enfermedad (PE), enfermedad estable (EE), respuesta parcial (RP) o respuesta completa (RC), de acuerdo con los criterios RECIST.

## II.3. Estudio de los niveles de los marcadores de remodelado óseo.

### II.3.1. Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX)

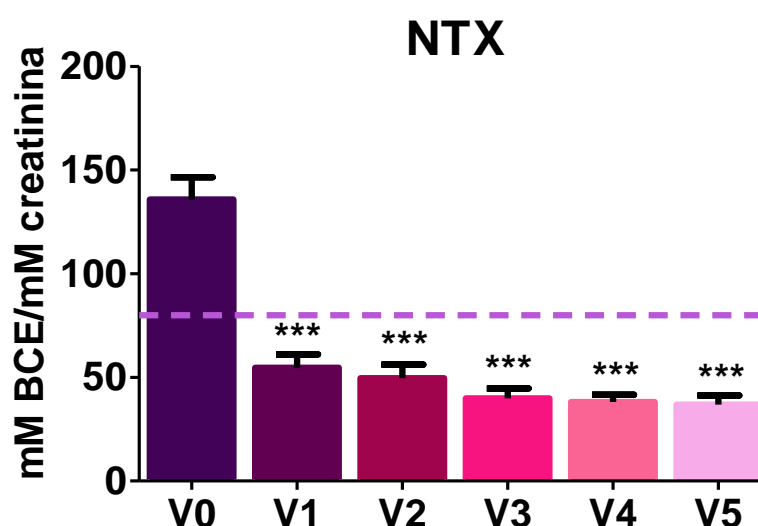
En la visita basal la media de los niveles de CTX de todos los pacientes del estudio fue mayor que el límite superior de normalidad (0,99  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  creatinina). Tras empezar el tratamiento con ácido zoledrónico, los niveles de este marcador de resorción disminuyeron significativamente desde la V1, estando desde ese momento dentro del rango de valores normales (**Figura 32**). En la visita basal un 42,26% de los pacientes presentaban niveles por encima de la normalidad. Este porcentaje pasó a ser de 8,63% en la visita 1 tras haber empezado el tratamiento con ácido zoledrónico. La proporción de pacientes con niveles de CTX elevados siguió disminuyendo hasta llegar a ser de un 2,68% en la última visita del estudio (**Figura 35**). Se observó una correlación significativa entre los valores de  $\alpha\text{CTX}$  en el inicio del estudio y en la V1 ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,3898$ ).



**Figura 32.** Niveles de Telopéptido carboxiterminal del colágeno I (CTX) en la orina de pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas desde el principio del estudio con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días). Significación estadística \*\*\*  $P < 0,0001$  vs V0, utilizando el test no paramétrico Wilcoxon. Rango de normalidad 0,10-0,99  $\mu\text{g}/\text{mmol}$  creatinina.

### II.3.2. Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX)

Al comienzo del estudio el valor medio de NTX fue mayor que el límite superior de normalidad (80nM ECO/mM creatinina). Tres meses después de empezar el tratamiento con ácido zoledrónico (V1) los niveles medios de este marcador de remodelado óseo se normalizaron y se mantuvieron dentro del rango de valores normales hasta el final del estudio (**Figura 33**). Del mismo modo, el porcentaje de pacientes con valores patológicos de NTX disminuyó desde un 51,88% en la visita basal a un 13,70% en la V1, y llegó a ser de 5,36 al final del estudio (**Figura 35**). Los niveles de NTX en V0 también se correlacionaron con los de este mismo marcador en V1 ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,2908$ ).

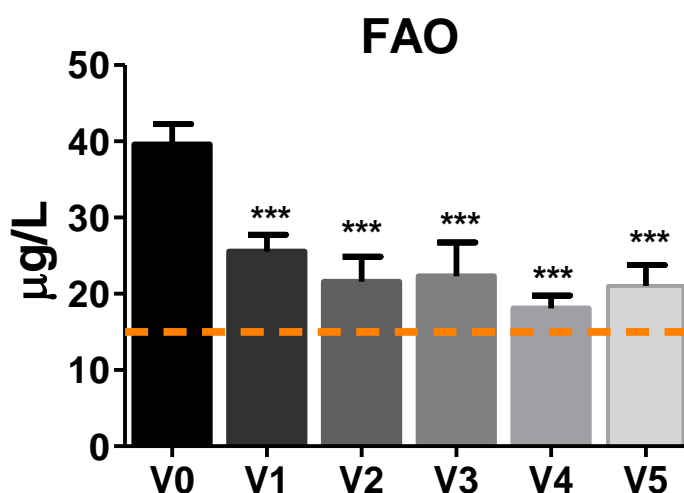


**Figura 33.** Niveles de Telopéptido aminoterminal del colágeno I (NTX) en orina en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas desde el principio del estudio con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días). Significación estadística \*\*\*  $P < 0,0001$  vs V0, utilizando el test no paramétrico Wilcoxon. Rango de normalidad 15-80nM ECO/mM creatinina.

### II.3.3. Fosfatasa alcalina ósea (FAO)

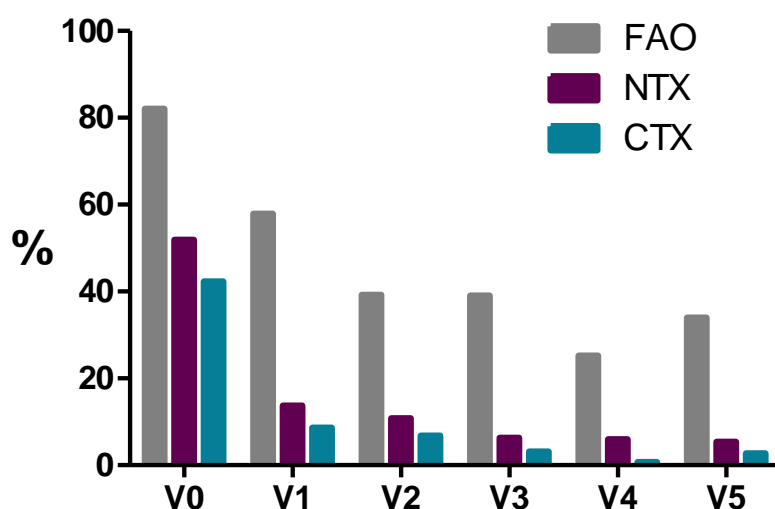
Los niveles del marcador fosfatasa alcalina ósea, fueron mayores que el límite superior de normalidad en la visita basal y en todas las visitas de seguimiento del estudio. Sin embargo, a partir de la primera visita, tras empezar el tratamiento con ácido zoledrónico, se registró un

descenso significativo de los niveles de este marcador, que se mantuvieron constantes a lo largo de las diferentes visitas del estudio (**Figura 34**). Por otra parte, el porcentaje de pacientes que tenía niveles elevados del marcador FAO disminuyó a lo largo del estudio, siendo este porcentaje del 82% en la visita basal y llegando al 33,9% al final del estudio (**Figura 35**). Al igual que los otros dos marcadores de remodelado óseo estudiados, los niveles de FAO en la visita basal, se correlacionaron con los de la primera visita del estudio ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,5572$ ).



**Figura 34.** Niveles de Fosfatasa alcalina ósea (FAO) en suero en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas desde el principio del estudio con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días). Significación estadística \*\*\*  $P < 0,0001$  vs V0, utilizando el test no paramétrico Wilcoxon. Rango de normalidad 3-15µg/L.

Los distintos tratamientos que recibieron las pacientes (quimioterapia o terapia endocrina) no supusieron diferencias en cuanto al porcentaje de pacientes que presentaron niveles normales o patológicos de los marcadores de remodelado óseo.



**Figura 35** Porcentaje de pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días) desde el comienzo del estudio, que muestran niveles elevados de los marcadores de remodelado óseo CTX, NTX y FAO en cada una de las visitas del estudio.

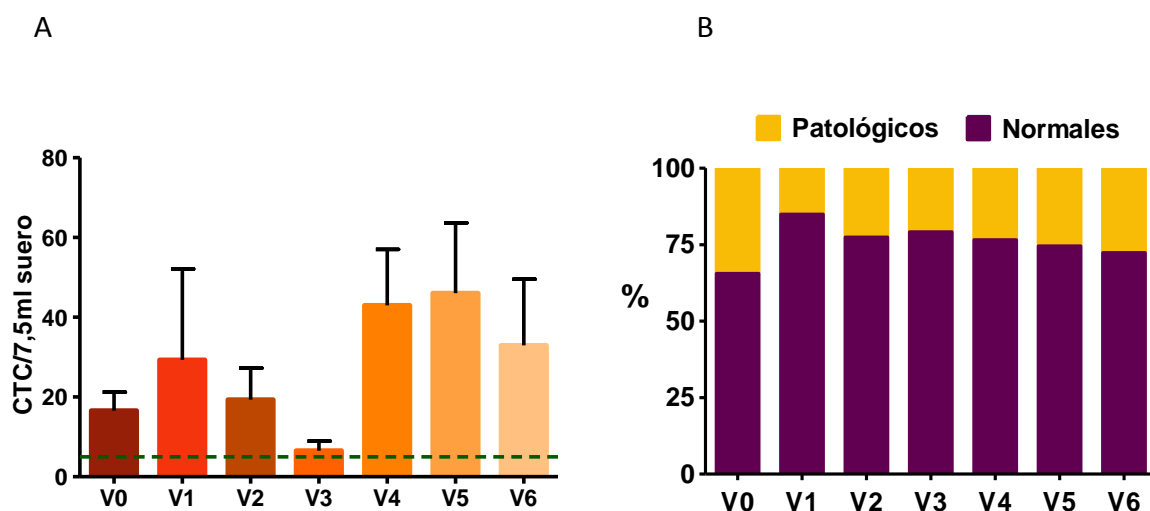
#### **II.4. Estudio del número de células tumorales circulantes (CTCs)**

El número de CTCs fue mayor que el límite superior de normalidad a lo largo de los 24 meses que duró el estudio. Sin embargo, en la visita 2 se pudo registrar un descenso del número medio de células tumorales circulantes de las pacientes (**Figura 36A**). Por otra parte, tampoco se encontraron cambios en el porcentaje de pacientes con valores patológicos de CTCs, excepto en la primera visita tras el comienzo del tratamiento con ácido zoledrónico. En dicha visita el porcentaje de pacientes con valores anormales de CTCs descendió significativamente hasta un 15%, con respecto al 34,4% encontrado en la visita basal (**Figura 36B**).

#### **II.1. Capacidad predictiva de los marcadores de remodelado**

En primer lugar se construyeron curvas ROC para cada uno de los marcadores de remodelado óseo y para las células tumorales circulantes, con respecto a cada uno de los parámetros a estudiar (riesgo de mortalidad, progresión de la enfermedad y aparición de EREs). Para ello, se utilizaron los valores de dichos marcadores en la visita basal y según los cambios de cada

uno de ellos en la primera visita (V1/V0). Utilizando este tipo de curvas se obtuvieron puntos de corte que maximizan simultáneamente la sensibilidad y especificidad de cada marcador. Los datos obtenidos se muestran en la **Tabla 6**, las curvas ROC se muestran en el **Anexo I**.



**Figura 36. A)** Número de células tumorales circulantes (CTC) en suero en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, tratadas con ácido zoledrónico (4mg cada 21-28 días) desde el comienzo del estudio. **B)** Porcentaje de pacientes con niveles patológicos y normales de CTCs, cada una de las visitas del estudio.

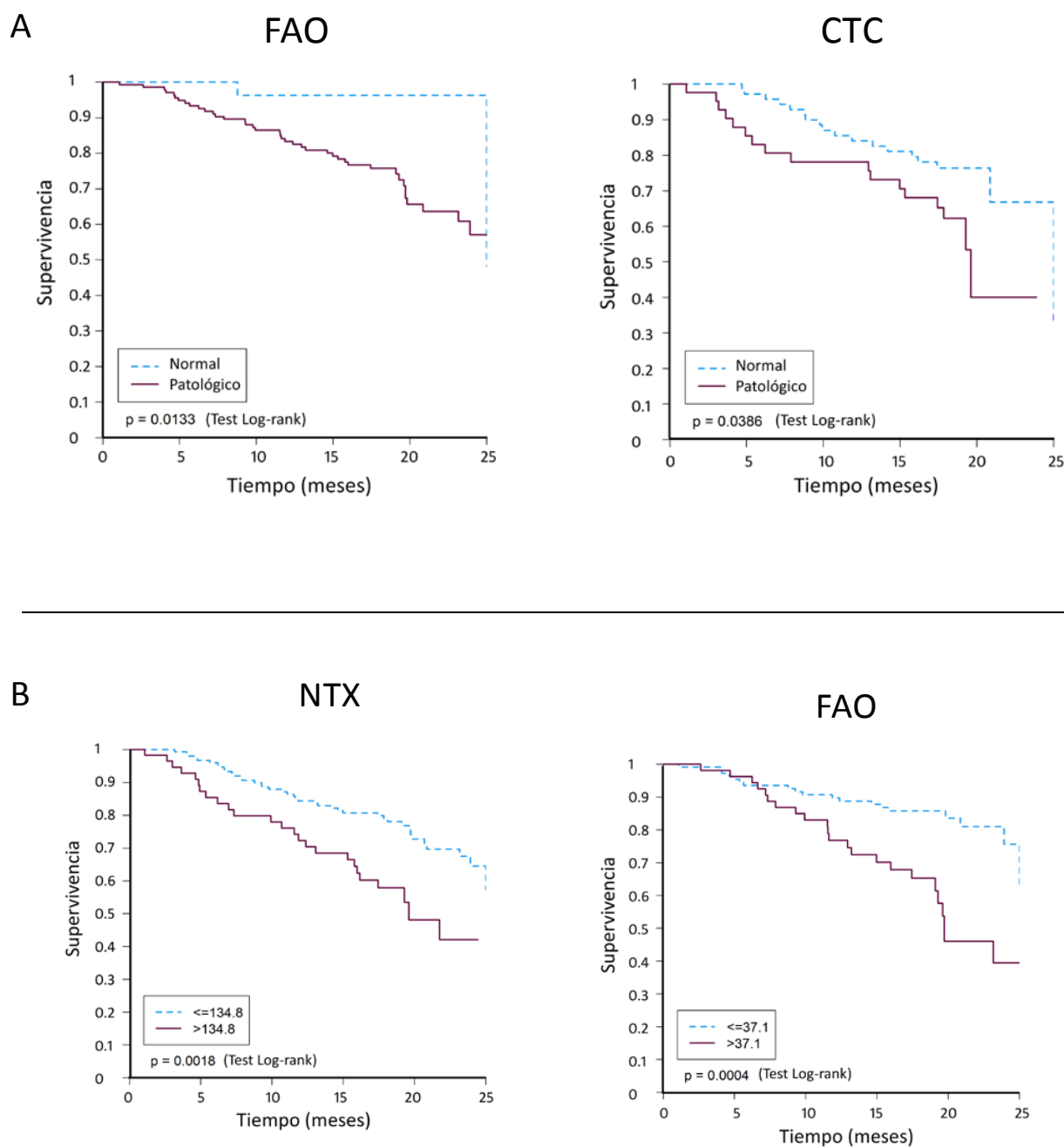
**Tabla 6.** Valores de los biomarcadores que maximizan la sensibilidad y especificidad de los mismos, obtenido mediante curvas ROC.

	EREs		Progresión		Mortalidad	
	V0	V1/V0	V0	V1/V0	V0	V1/V0
<b>NTX</b>	91,7	0,219	86,37	0,401	134,8	0,239
<b>ααCTX</b>	0,659	0,203	0,558	0,457	0,637	3,174
<b>FAO</b>	34,8	1,287	26,9	0,87	37,1	1,084
<b>CTC</b>	1	-	1	-	2	

### II.1.1. Mortalidad

Al analizar los valores basales de los marcadores, se comprobó mediante las curvas Kaplan-Meier, que valores patológicos de FAO ( $>15\mu\text{g/L}$ ) y de CTC ( $\geq 5\text{U}/7.5\text{mL}$  de suero) se asociaban significativamente con la mortalidad de las pacientes ( $p=0,0133$  y  $p=0,0386$ , respectivamente) (**Figura 37A**). Además, se encontró asociación entre la mortalidad y los valores de NTX mayores de  $134,8\text{nM ECO/mM creatinina}$  y de FAO mayores de  $37,1\mu\text{g/L}$  (puntos de corte calculados mediante curvas ROC) ( $p=0,0018$  y  $p=0,0004$ ; respectivamente) (**Figura 37B**).

Por otra parte, el análisis de modelos univariantes de regresión de Cox mostró a través del *hazard ratio*, que los pacientes con valores de  $\text{NTX} > 134,8\text{nM ECO/mM creatinina}$  tienen un riesgo de muerte 2,187 veces mayor que los pacientes con valores  $\leq 134,8\text{nM ECO/mM creatinina}$  (Intervalo de confianza 95%: 1,320 - 3,622;  $p=0,0024$ ). En el caso del marcador FAO los *hazard ratios* encontrados fueron los más elevados de todos los encontrados mediante el análisis de regresión de Cox para la mortalidad. Así, las pacientes que presentaran niveles patológicos de este marcador tenían 5,031 veces más riesgo de muerte que las que tuviesen niveles normales (Intervalo de confianza 95%: 1,214 - 20,839;  $p=0,0259$ ), y aquellas con niveles por encima de  $37,11\mu\text{g/L}$  tenían un riesgo de muerte de 3,089 veces mayor que las que presentaran niveles por debajo de este valor (Intervalo de confianza 95%: 1,684 – 5,665;  $p=0,0003$ ). También se encontró mediante el análisis de regresión de Cox, un *hazard ratio* de 2,009 para las pacientes con valores patológicos de CTCs (Intervalo de confianza 95%: 1,024-3,944;  $p=0,0426$ ) (**Tabla 7**).



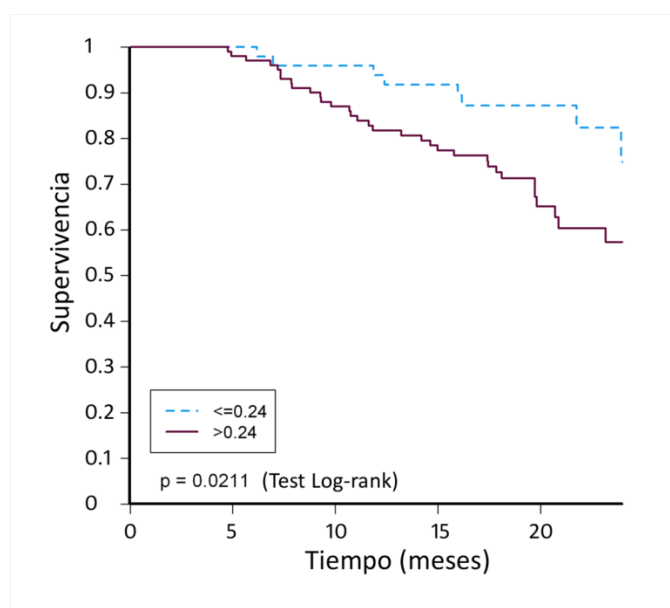
**Figura 37.** Curvas de supervivencia Kaplan-Meier tras el tratamiento con ácido zoledrónico durante 24 meses utilizando los valores basales de los biomarcadores, según sean: A) mayores que el límite superior de normalidad (normales o patológicos) o B) mayores al punto de corte obtenido en las curvas ROC.



**Tabla 7.** Modelos univariantes de Cox para mortalidad según valores basales

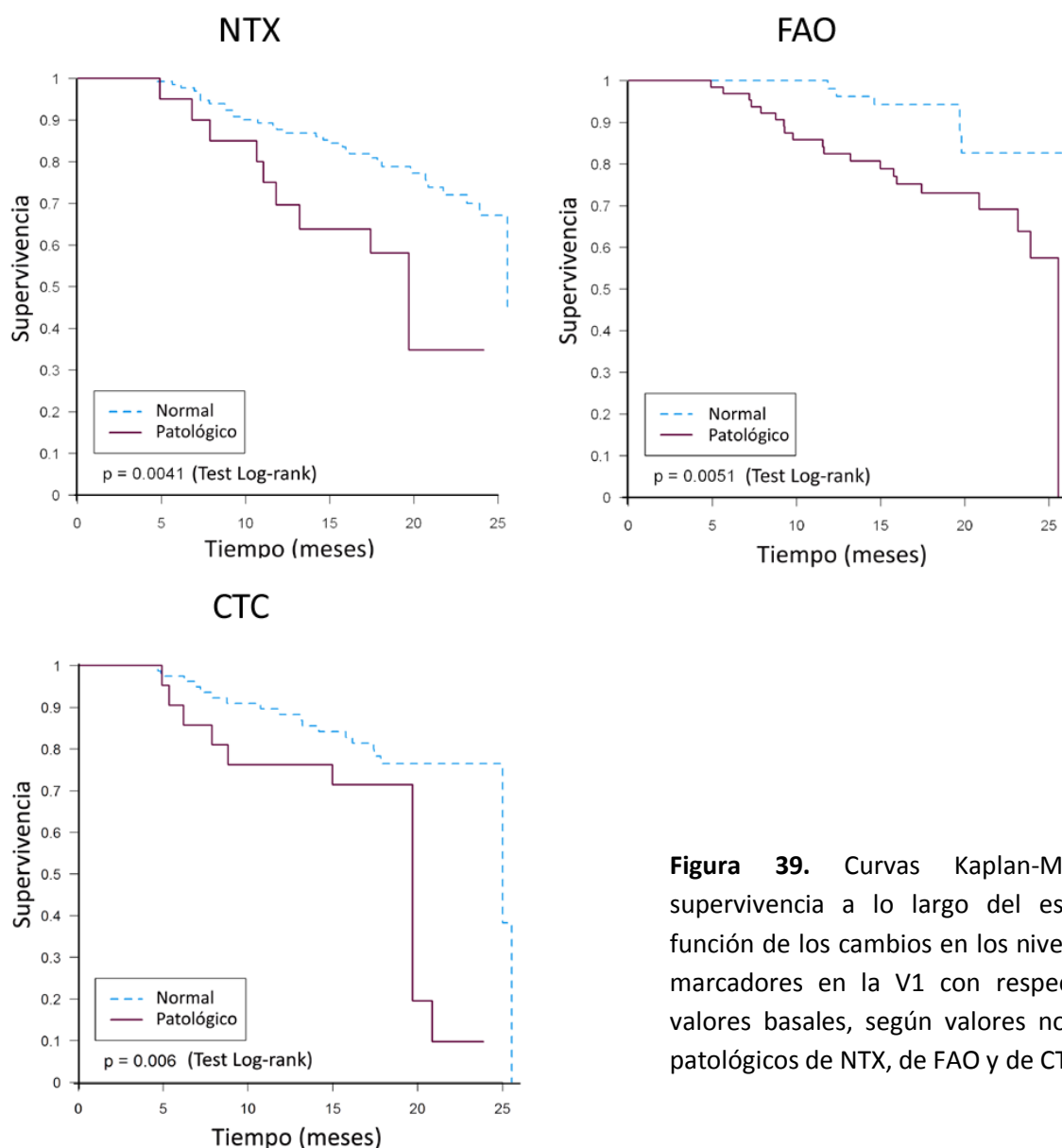
Marcador	Hazard ratio	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	Valor p
<b>NTX</b>				
Patológico*	1,404	0,3527	0,858-2,297	0,1764
> 134,8**	2,187	0,5630	1,320-3,622	0,0024
<b><math>\alpha\alpha</math>-CTX</b>				
Patológico*	1,092	0,2723	0,670-1,780	0,7233
>0,64**	1,296	0,3360	0,779-2,154	0,3179
<b>BSAP</b>				
Patológico*	5,031	36,479	1,214-20,839	0,0259
>37,1**	3,089	0,9560	1,684-5,665	0,0003
<b>CTC</b>				
Patológico*	2,009	0,6915	1,024-3,944	0,0426
>2**	1,691	0,5845	0,859-3,329	0,1287

\* Biomarcador mayor que el límite superior de normalidad; \*\*Biomarcador mayor que el punto de corte obtenido mediante las curvas ROC construidas utilizando los valores basales de los marcadores frente a la mortalidad. La magnitud del *hazard ratio* que el estudio puede detectar con un poder estadístico del 80% fue de 2,0 para la mortalidad.



**Figura 38.** Curva Kaplan-Meier de supervivencia a lo largo del estudio en función de los cambios en los niveles del marcador NTX en la V1 con respecto a los valores basales, según punto de corte de obtenido mediante curva ROC (V1/V0 = 0,24).

De la misma manera, se llevó a cabo este mismo análisis con respecto a los cambios ocurridos en los niveles de los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes en la V1 con respecto a los niveles de la V0. Las curvas Kaplan-Meier mostraron asociación significativa con la mortalidad cuando V1/V0 fue mayor de 0,24 ( $p=0,0211$ ) (**Figura 38**). Además, también se encontró asociación de la no normalización (niveles patológicos en V1) de FAO ( $p=0.0051$ ), NTX ( $p=0,0041$ ) y CTC ( $p=0,006$ ) con la mortalidad (**Figura 39**).



**Figura 39.** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia a lo largo del estudio en función de los cambios en los niveles de los marcadores en la V1 con respecto a los valores basales, según valores normales o patológicos de NTX, de FAO y de CTC.

El análisis de regresión de Cox mostró que las pacientes que no normalizaron los niveles de NTX en V1 tenían un hazard ratio de 2,756 (Intervalo de confianza 95%: 1,343 – 5,655;

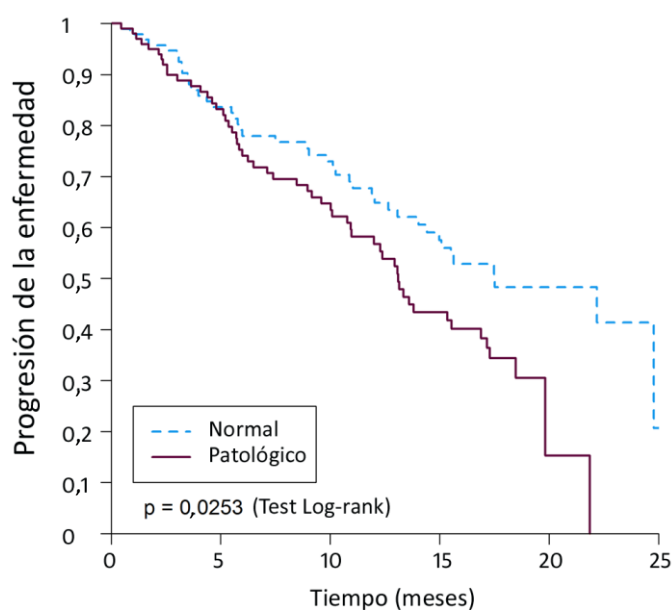
$p=0,0057$ ), mientras que aquellas pacientes con niveles V1/V0 de este marcador por encima de 0,24 tenían un riesgo de mortalidad 2,410 veces mayor que las que lo tenían por debajo de este valor (Intervalo de confianza 95%: 1,114 – 5,211;  $p=0,0254$ ). Por otro lado, el análisis de regresión de Cox se vio que las pacientes con valores patológicos de FAO en V1, tenían mayor riesgo de muerte (3,408 veces más) que las pacientes que en V1 normalizan los niveles de dicho marcador (Intervalo de confianza 95%: 1,367 – 8,498;  $p=0,0085$ ) (**Tabla 8**).

<b>Tabla 8.</b> Modelos univariables de Cox para mortalidad según cambios en V1				
<b>Marcador</b>	<b>Hazard ratio</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Intervalo de confianza (95%)</b>	<b>Valor p</b>
<b>NTX</b>				
Patológico*	2,756	10,108	1,343-5,655	0,0057
> 0,24***	2,410	0,9482	1,114-5,211	0,0254
<b><math>\alpha\alpha</math>-CTX</b>				
Patológico*	1,427	0,6831	0,559-3,647	0,4571
>3,17***	NA	NA	NA	NA
<b>BSAP</b>				
Patológico*	3,408	15,888	1,367-8,498	0,0085
>1,08***	1,820	0,8528	0,727-4,560	0,2010
<b>CTC</b>				
Patológico*	2,981	12,394	1,320-6,734	0,0086

\*Niveles del marcador por encima del límite superior de normalidad \*\*\*Valores de marcador en V1/valores de marcador en V0 mayor que el punto de corte obtenido de la correspondiente curva ROC. La magnitud del hazard ratio que el estudio puede detectar con un poder estadístico del 80% fue de 2,0 para la mortalidad.

### II.1.2. Progresión de la enfermedad

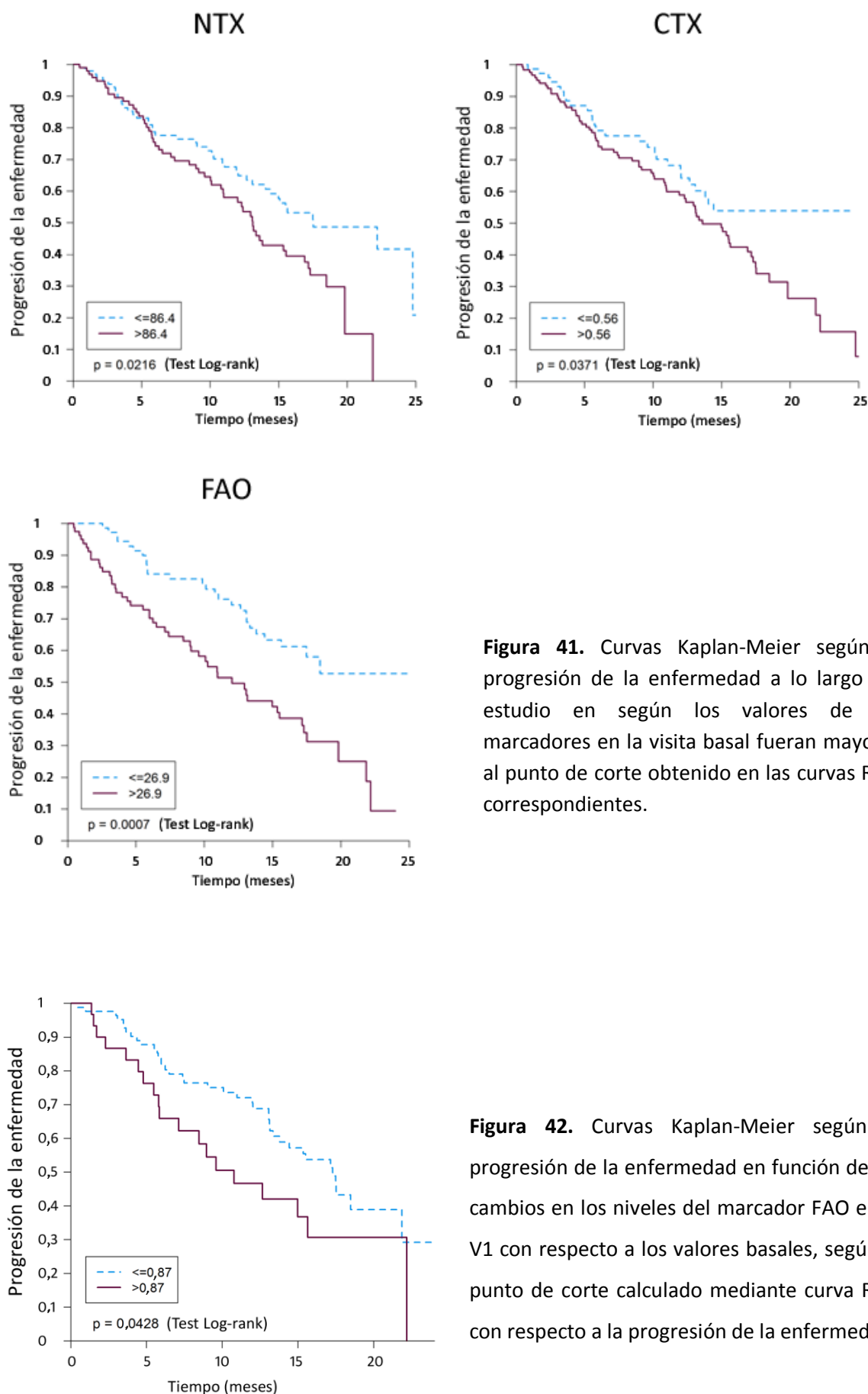
Con respecto a la progresión de la enfermedad, se encontraron los resultados que se detallan a continuación. El único marcador cuya curva Kaplan-Meier fue significativa, utilizando el límite superior de normalidad en la visita basal, fue NTX ( $p=0,0253$ ) (**Figura 40**).



**Figura 40.** Curva Kaplan-Meier según la progresión de la enfermedad utilizando los valores basales del biomarcador NTX, utilizando el límite superior de normalidad (normales o patológicos)

Utilizando los puntos de corte de las respectivas curvas ROC, se encontró asociación significativa de la progresión de la enfermedad con los niveles mayores de 86,4nM ECO/mM creatinina de NTX ( $p=0,0216$ ), de 0,56 $\mu$ g/mmol creatinina de CTX ( $p=0,0371$ ) y de 26,9 $\mu$ g/L de FAO (0,0007) (**Figura 41**). Asimismo, se obtuvo asociación significativa de este parámetro con respecto a FAO cuando V1/V0 fue mayor de 0,87 ( $p=0,0428$ ) (**Figura 42**).

Aunque se obtuvieron todas estas asociaciones significativas, el único marcador que presentó un *hazard ratio* mayor de 1,8 (poder estadístico de al menos el 80%) fue la FAO. De esta forma, las pacientes que presentaran en la visita basal niveles de este marcador por encima de 26,9 $\mu$ g/L tenían un riesgo de que su enfermedad progresase 2,25 veces mayor (Intervalo de confianza 95%: 1,39 – 3,62;  $p=0,0009$ ) que las pacientes con niveles basales de FAO menores de dicho valor (**Tabla 6r**)



**Figura 41.** Curvas Kaplan-Meier según la progresión de la enfermedad a lo largo del estudio en según los valores de los marcadores en la visita basal fueran mayores al punto de corte obtenido en las curvas ROC correspondientes.

**Figura 42.** Curvas Kaplan-Meier según la progresión de la enfermedad en función de los cambios en los niveles del marcador FAO en la V1 con respecto a los valores basales, según el punto de corte calculado mediante curva ROC con respecto a la progresión de la enfermedad.

Tabla 9. Modelos de Cox para la progresión de la enfermedad				
Modelos univariantes de Cox para progresión según valores basales				
Marcador	Hazard ratio	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	Valor p
<b>NTX</b>				
Patológico*	1,591	0,3336	1,055-2,400	0,0267
> 86,4**	1,609	0,3360	1,068-2,422	0,0229
<b><math>\alpha\alpha</math>-CTX</b>				
Patológico*	1,215	0,2497	0,813-1,818	0,3423
>0,56**	1,599	0,3634	1,024-2,497	0,0389
<b>BSAP</b>				
Patológico*	1,412	0,4807	0,725-2,752	0,3103
>26,9**	2,246	0,5490	1,391-3,626	0,0009
<b>CTC</b>				
Patológico*	1,263	0,3641	0,718-2,222	0,4184
>1**	1,576	0,4446	0,907-2,740	0,1068
Modelos univariantes de Cox para progresión según cambios en V1				
Marcador	Hazard ratio	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	Valor p
<b>NTX</b>				
Patológico*	1,557	0,4745	0,857-2,829	0,1464
> 0,46**	1,154	0,2749	0,724-1,841	0,5466
<b><math>\alpha\alpha</math>-CTX</b>				
Patológico*	1,670	0,5693	0,856-3,258	0,1322
>0,4**	1,272	0,3151	0,783-2,067	0,3311
<b>BSAP</b>				
Patológico*	1,422	0,3722	0,851-2,375	0,1789
>0,87**	1,752	0,4917	1,011-3,037	0,0458
<b>CTC</b>				
Patológico*	1,914	0,7236	0,913-4,016	0,0858

\*Niveles del marcador por encima del límite superior de normalidad \*\*Niveles del marcador mayores que el punto de corte calculado mediante curvas ROC, con los niveles basales de los marcadores frente a la mortalidad. \*\*\*Valores de marcador en V1/valores de marcador en V0 mayor que el punto de corte obtenido de la correspondiente curva ROC. La magnitud del *hazard ratio* que el estudio puede detectar con un poder estadístico del 80% fue de 1,8 para la progresión de la enfermedad.

### II.1.3. Eventos relacionados con el esqueleto

Del mismo modo, se llevó a cabo el análisis de los marcadores para obtener, mediante curvas ROC, puntos de corte que maximicen simultáneamente la sensibilidad y la especificidad de cada marcador con respecto a la aparición de EREs, utilizando los valores basales y los cambios en la visita 1.

Los valores obtenidos en dichas curvas y los valores de normalidad de cada marcador fueron utilizados para llevar a cabo curvas de supervivencia Kaplan-Meier. Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre ninguno de los marcadores de remodelado óseo y los eventos relacionados con el esqueleto. Por ello no se siguió adelante con el estudio de modelos de regresión de Cox.

## II.1. Correlación entre los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes

Al inicio del estudio, los niveles de los tres marcadores de remodelado óseo se correlacionaron significativamente con valores de CTC (**Tabla 10**). La FAO mantuvo dicha correlación significativa con las CTC durante todo el estudio, mientras que la correlación entre  $\alpha$ CTX y NTX con CTC se perdió en V1 y V3, respectivamente. A partir de entonces, una correlación significativa con CTC se observó de nuevo para ambos marcadores de remodelado óseo en V5 y V6.

**Tabla 10. Correlación entre los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes durante los primeros 18 meses del estudio**

Visita	Marcador	N	Coefficiente	Valor P
<b>0</b>	<b>NTX</b>	120	<b>0.2893</b>	<b>0.0014</b>
	<b>αα-CTX</b>	120	<b>0.2738</b>	<b>0.0025</b>
	<b>FAO</b>	95	<b>0.2880</b>	<b>0.0047</b>
<b>1</b>	<b>NTX</b>	94	<b>0.3651</b>	<b>0.0003</b>
	<b>αα-CTX</b>	94	0.1666	0.1085
	<b>FAO</b>	76	<b>0.3344</b>	<b>0.0031</b>
<b>2</b>	<b>NTX</b>	85	<b>0.2224</b>	<b>0.0408</b>
	<b>αα-CTX</b>	85	0.1027	0.3494
	<b>FAO</b>	73	<b>0.3175</b>	<b>0.0062</b>
<b>3</b>	<b>NTX</b>	74	0.1989	0.0894
	<b>αα-CTX</b>	74	0.1519	0.1965
	<b>FAO</b>	63	<b>0.4577</b>	<b>0.0002</b>
<b>4</b>	<b>NTX</b>	62	0.0436	0.7365
	<b>αα-CTX</b>	62	-0.1632	0.2051
	<b>FAO</b>	56	<b>0.3703</b>	<b>0.0050</b>
<b>5</b>	<b>NTX</b>	56	<b>0.2783</b>	<b>0.0378</b>
	<b>αα-CTX</b>	57	<b>0.2753</b>	<b>0.0382</b>
	<b>FAO</b>	51	<b>0.4524</b>	<b>0.0009</b>
<b>6</b>	<b>NTX</b>	53	<b>0.3764</b>	<b>0.0055</b>
	<b>αα-CTX</b>	52	<b>0.3463</b>	<b>0.0119</b>
	<b>FAO</b>	52	<b>0.3860</b>	<b>0.0047</b>







La aparición de **metástasis óseas** derivadas de diversos tumores primarios (entre los que se encuentran el cáncer de mama y el de pulmón) suponen una disminución drástica de la supervivencia de los pacientes y un deterioro de la calidad de vida de los mismos[24]. Los métodos de detección de lesiones óseas asociadas a procesos cancerígenos usados hoy en día (gammagrafía, TC, RM, radiografías) tienen limitaciones a la hora de ser empleadas (son técnicas caras, que suelen implicar el uso de radiación), por lo que no pueden ser usadas con la frecuencia deseada. Por otro lado, presentan el inconveniente de que no son capaces de detectar la dispersión de los tumores primarios hacia el hueso antes de la aparición **de lesiones óseas** ni de detectar los pequeños cambios que ocurren durante el desarrollo de las metástasis en el hueso[50]. Por ello, se hace necesario encontrar herramientas más sensibles a la hora de detectar la presencia de metástasis y que permitan un seguimiento efectivo del tratamiento de la enfermedad metastásica ósea.

La existencia de metástasis en el hueso implica un aumento del grado de remodelado, que produce como consecuencia cambios en los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo. De hecho, estos biomarcadores han sido utilizados en diversos estudios para el diagnóstico de las metástasis óseas[10]. Sin embargo, no existe un consenso sobre la aplicación de estos biomarcadores en el diagnóstico clínico de esta enfermedad. Uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido evaluar la capacidad de los marcadores de formación y de resorción como herramientas de diagnóstico de metástasis óseas. En una segunda fase del trabajo tratamos también de establecer una correlación entre los niveles de los marcadores y la progresión clínica de la enfermedad. El estudio se ha efectuado desde dos aproximaciones: utilizando un modelo traslacional experimental en ratones y mediante un estudio clínico observacional en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas.

Con respecto al estudio traslacional, en esta tesis el análisis de los marcadores bioquímicos se ha llevado a cabo utilizando un modelo *in vivo* de ratón con cáncer de pulmón y metástasis óseas. Dado que la aparición de metástasis óseas de forma espontánea en los animales ocurre poco frecuentemente, se ha utilizado un modelo de xenotransplante que había sido previamente validado[71], y que reproduce fielmente la enfermedad metastásica ósea en humanos. Inoculamos una línea celular de cáncer de pulmón humano en ratones inmunodeficientes, y se seleccionaron *in vivo* las subpoblaciones celulares con tropismo

específico por el hueso. Esta estrategia ha sido utilizada previamente por otros autores en el melanoma y en cáncer de próstata y de mama[33,56,97]. Dado que la inoculación intracardíaca de las células A549 hace que éstas pasen directamente al torrente sanguíneo, este modelo animal no reproduce los primeros pasos del proceso metastásico (proliferación celular, angiogénesis, intravasación). Sin embargo, para este trabajo las fases tempranas de las metástasis no son relevantes, ya que nuestro objetivo de estudio es encontrar marcadores que se correlacionen con la presencia de células tumorales en el hueso y la extensión de las metástasis.

Para comprobar su validez como modelo animal de metástasis osteolíticas, se han llevado a cabo técnicas de imagen, ya que no podemos evaluar de otras formas la progresión de la enfermedad, como hicimos posteriormente en el estudio en pacientes. Los ensayos realizados utilizando bioluminiscencia resultan muy útiles en este tipo de estudio, pues nos permiten ver, a tiempo real, si la inyección intracardíaca ha sido realizada con éxito. Mediante esta técnica se ha comprobado que la **carga tumoral** en el hueso aumenta a lo largo del tiempo, lo que demuestra el tropismo específico por el hueso de las células tumorales utilizadas. El hecho de que la carga tumoral aumente una vez asentadas las células A549 en el hueso, refleja que este tejido supone un “suelo fértil” para el crecimiento de estas células tumorales. De hecho, debido al círculo vicioso el número de células tumorales aumenta de forma casi exponencial. Según aumenta la presencia de las células tumorales también aumenta la extensión de las **lesiones óseas**, como se ha podido comprobar mediante la realización de radiografías y microtomografía. Sin embargo, mediante estas dos técnicas, la existencia de metástasis en el hueso se detecta mucho después que con bioluminiscencia (unas dos semanas después) y no es capaz de detectar micrometástasis, como ocurre en la práctica clínica y como han descrito otros autores[86]. Por otra parte la tinción de FATR, ha mostrado que el aumento del área de las lesiones óseas se produce como consecuencia del aumento de la actividad de los osteoclastos. Esto es debido a que las células tumorales liberan factores que estimulan la activación de los osteoclastos en la interfase tumor-hueso. Además, se ha observado que la anidación e invasión en el hueso por parte de las células tumorales produce una desestructuración de este tejido a nivel histológico, tanto de la médula como de las regiones trabecular y cortical.

Durante el desarrollo de las metástasis óseas se produce un incremento exagerado en el grado de remodelado óseo producido por la presencia de células tumorales en el hueso: Aumenta la actividad de los osteoclastos, en el caso de las metástasis osteolíticas, o de los osteoblastos, en el caso de las osteoblásticas. En los últimos años, se ha venido utilizando el ácido zoledrónico, un fármaco que inhibe la actividad de los osteoclastos, en el tratamiento de esta enfermedad, como modo de detener el efecto de las células tumorales sobre el hueso. Debido al proceso de acoplamiento, la reducción del grado de resorción ósea provocada por el ácido zoledrónico, hace que la formación también descienda. Es decir, se produce una interrupción del círculo vicioso, que tiene lugar durante el desarrollo tanto de las metástasis osteolíticas como el de las osteoblásticas. Por ello, el ácido zoledrónico es útil en el tratamiento de ambos tipos de metástasis óseas. Recientemente se está empezando a utilizar el fármaco **denosumab** (anticuerpo monoclonal humano que se une a RANKL e inhibe su función osteoclastogénica), ya que presenta menos limitaciones que el ácido zoledrónico (su administración es subcutánea en vez de intravenosa, presentan menos complicaciones como osteonecrosis de la mandíbula o hipocalcemia, no está limitado su uso en pacientes con insuficiencia renal). Sin embargo, y aunque se necesitan más estudios pre-clínicos y clínicos comparativos, el ácido zoledrónico demuestra superioridad en cuanto a su actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo* en comparación con el fármaco denosumab[100].

Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto del ácido zoledrónico sobre las metástasis óseas y la variación de los niveles de los marcadores de remodelado óseo como consecuencia de la acción de este fármaco antirresortivo. Como era de esperar debido a su mecanismo de acción, este fármaco hace que disminuya el número de osteoclastos en la interfase tumor-hueso. El resultado es la reducción de la extensión de las lesiones osteolíticas, como se ha comprobado mediante radiografías y microtomografía. Por otro lado, hemos visto que en nuestro modelo animal, el ácido zoledrónico consigue frenar el aumento de carga tumoral en los huesos de los ratones. Diversos autores describen un efecto de este fármaco en las distintas fases del proceso metastásico (viabilidad, migración, invasión, etc.) en experimentos *in vitro*[7,32,37], e incluso Hirbe y cols[46] mediante un modelo animal de xenotransplante de células tumorales, describen un descenso del crecimiento tumoral en el hueso de forma independiente a la presencia de osteoclastos. Además, este fármaco ha demostrado en varios estudios que es capaz de inducir la apoptosis de células cancerígenas *in vitro*[72] y, en

concreto, de la línea celular A549 utilizada en esta tesis[98]. Los resultados que hemos obtenido en nuestro trabajo, no nos permiten identificar en qué procesos está actuando el ácido zoledrónico. En cualquier caso, se puede concluir que el círculo vicioso que ocurre durante el desarrollo de las metástasis osteolíticas, está siendo interrumpido, bien a través de la disminución del grado de remodelado óseo, bien afectando directamente a la viabilidad de las células tumorales, o bien a través de ambos procesos.

Todos estos datos nos sugieren que el modelo animal que hemos utilizado posee diversas características del proceso metastásico en humanos: aumento de la carga tumoral en los huesos, que induce la activación de células FTR+ (osteoclastos) y, consecuentemente, provoca la aparición de lesiones osteolíticas. Se ha conseguido detener estos procesos utilizando el bifosfonato ácido zoledrónico. Dados estos resultados, consideramos que nuestro modelo animal es suficientemente representativo para estudiar cómo se comportan los marcadores de remodelado óseo e identificar nuevos marcadores bioquímicos, en la enfermedad metastásica ósea y su tratamiento con ácido zoledrónico.

En el modelo animal de metástasis osteolíticas, que habíamos previamente validado, se analizaron los niveles de los marcadores de resorción,  $\alpha$ -CTX y FTR5b, y de formación, BGP y PINP. Es importante resaltar, que en los estudios en animales las determinaciones de CTX que se pueden realizar, miden únicamente niveles de la isoforma  $\alpha$  de este péptido. Dado que la isoforma  $\beta$  se genera según avanza la edad del colágeno y, ya que los roedores poseen una tasa de remodelado óseo muy elevada, la isomerización del CTX en su forma  $\beta$  no llega a realizarse.

Llevar a cabo ensayos utilizando modelos animales es de gran importancia, ya que estos tipos de abordaje poseen muchas ventajas frente a los estudios en humanos, que presentan la dificultad de encontrarse en diferentes condiciones basales (tratamientos, sexo, edad,...), lo que supone un sesgo a la hora de llevar a cabo estudios estadísticos. Existen pocos trabajos en la literatura que estudien los marcadores de remodelado óseo en modelos animales de metástasis óseas, y los que llevan a cabo el análisis de estos biomarcadores lo hacen como complemento a otros experimentos y no como objetivo principal. En nuestro trabajo, encontramos que debido al proceso de acoplamiento y, aunque sea un modelo de metástasis osteolíticas que produce un aumento de la resorción, la presencia de las células tumorales en

el hueso supuso un aumento de los niveles de todos los marcadores estudiados, tanto de formación como de resorción, en los ratones tumorales con respecto a los sanos en todos los tiempos estudiados. De la misma forma, aunque el tratamiento con ácido zoledrónico supone la inhibición del proceso de resorción, este fármaco hizo que los niveles de todos los marcadores estudiados (de formación y de resorción) descendiesen, debido igualmente al proceso de acoplamiento. Estos resultados coinciden con los del trabajo de Hung y cols [51] en el que ven que, en un modelo de ratón con cáncer de próstata y metástasis óseas, el tratamiento con ácido zoledrónico hace que los niveles de FTR5b y BGP sean menores en el grupo de ratones que recibió dicho tratamiento que los del grupo control que no fue tratado, lo cual se refleja en un descenso de la osteolisis inducida por las células tumorales. Por otra parte, Garnero y cols [40] llevaron a cabo un trabajo en el que analizaron los niveles de CTX y PICP en distintas enfermedades óseas. Uno de los análisis lo realizaron en animales inoculados con células de cáncer de mama que desarrollaron lesiones óseas. Estos autores vieron que el Ibandronato (otro bifosfonato nitrogenado) consigue que los niveles de CTX, así como el grado de osteolisis, sean menores en los ratones tratados que en los que no recibieron tratamiento.

Uno de los puntos más importantes del trabajo *in vivo* realizado en esta tesis, ha sido el estudio de las correlaciones de los marcadores de remodelado óseo con la extensión de las metástasis óseas y la carga tumoral. Los resultados muestran que los marcadores de resorción son los que mejor se correlacionan con la carga tumoral y la extensión de las lesiones óseas a día 21 y, únicamente con las lesiones osteolíticas a día 28. En el último día del estudio ninguno de los marcadores de remodelado óseo se correlaciona con la carga tumoral, debido probablemente al que número de células tumorales presentes en el hueso es muy elevado, es decir, la enfermedad está muy extendida a nivel sistémico. Los marcadores de formación sólo se correlacionan con los rayos X a día 21. En esta momento del estudio la presencia de células tumorales en el hueso ha hecho que aumente la resorción ósea y, por el proceso de acoplamiento, los marcadores de formación se encuentran en unos niveles en los cuales también se correlacionan con la extensión de las lesiones osteolíticas.

El estudio que hemos realizado sobre los niveles de los marcadores de remodelado nos permite revelar los cambios que ocurren en el hueso, inducidos por la presencia de células tumorales. Los marcadores bioquímicos miden procesos biológicos relacionados con la

homeostasis del hueso, tales como la degradación del colágeno ( $\alpha$ CTX), la actividad de los osteoclastos durante la resorción de hueso (FAT5b), o la de los osteoblastos durante la formación de hueso (BGP y PINP), y no están directamente relacionados con el proceso metastásico. Los cambios que ocurren en el hueso en las fases tempranas de nuestro estudio son insignificantes, si comparamos los grupos sano y tumoral. Por este motivo, no hemos encontrado correlaciones significativas de los marcadores de remodelado óseo y la carga tumoral, en las primeras fases de nuestro estudio.

Por último, en este estudio traslacional se ha intentado identificar microRNAs que sirvan como marcadores para el diagnóstico de las metástasis óseas. Se analizó el perfil de expresión de 380 microRNAs en el suero de los ratones inoculados con las células A549 y se comparó con el de los ratones controles (no inoculados con las células tumorales). Se seleccionó un conjunto final de cinco microRNAs diferencialmente expresados en el grupo tumoral con respecto al grupo de ratones sanos, y cuyos niveles de expresión son consistentes con el estado y la progresión de la enfermedad. De los microRNAs seleccionados miR-326 fue el que mejor correlación mostró con respecto a la carga tumoral, incluso en fases tempranas del proceso metastásico. Estos resultados sugieren que el miR-326 podría ser potencialmente un biomarcador en los cánceres con tendencia a formar metástasis óseas. Dada la falta de homología entre las secuencias de miR-326 de ratones y de humanos, los niveles circulantes de miR-326 se deben al aumento de la carga tumoral, y no a que este miRNA haya sido liberado desde el hueso como respuesta a la presencia de células tumorales. Sin embargo, debido a la retroalimentación entre las células tumorales y las óseas, que tiene lugar durante el círculo vicioso, el aumento de los niveles de miR-326 refleja también que los factores derivados del huésped están actuando sobre las células tumorales, favoreciendo su crecimiento. De hecho, miR-326 ha sido implicado previamente en la diferenciación linfocítica [32], la quimiorresistencia [33] y en actividades supresoras de tumores [34], lo que implica que la liberación de miR-326 por parte del tumor no sólo está ocurriendo de forma autónoma, sino que puede ser debida también a que los factores secretados por el huésped están actuando sobre las células tumorales. Por otra parte, las diferencias de expresión en el perfil de miRNAs en suero aumentaron de forma paralela al crecimiento de las células metastásicas presentes en el hueso. Esto explica por qué la bioluminiscencia, la técnica de imagen más sensible utilizada en nuestro estudio y que se asocia con el número de células tumorales, también



muestra una fuerte correlación con la expresión de ciertos miRNAs. Según lo observado en nuestros resultados, se podría decir que miR-326 u otros miRNAs podrían predecir la aparición de metástasis óseas, antes de su detección mediante técnicas de imagen. A pesar de ello, miR-326 no se correlacionó con la respuesta al tratamiento. Hemos observado cambios notables en el perfil de expresión de miRNAs de los ratones no tratados en comparación con los ratones tratados con ácido zoledrónico. Es decir, los diferentes miRNAs se asociaron de diferente forma con la respuesta al tratamiento. Sugerimos que los medicamentos contra el cáncer pueden afectar y modificar los perfiles de expresión de miRNAs, y por lo tanto, diferentes firmas de miRNAs podrían utilizarse para monitorizar la respuesta al tratamiento y la progresión de la enfermedad.

En cualquier caso, la utilización de miRNAs como marcadores de diagnóstico es un tema tan novedoso, que se necesitan muchos más estudios antes de poder poner en marcha una técnica que pueda ser utilizada por el clínico. La evaluación de la sensibilidad y especificidad de estos nuevos marcadores mediante la construcción de curvas ROC y otras alternativas estadísticas, es muy importante para conocer los rangos de normalidad de los miRNAs que nos permitan diagnosticar la enfermedad metastásica ósea (en nuestro caso) o para decidir el tratamiento de los pacientes afectados de dicha patología. Sería necesario llevar a cabo estudios con otros modelos de metástasis óseas en paralelo, que nos permitan identificar marcadores comunes del proceso metastásico del hueso de manera independiente al tipo de tumor primario.

La segunda parte de esta tesis se centra en el estudio de los marcadores de remodelado óseo en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas durante el tratamiento con ácido zoledrónico. Se han analizado los niveles de los marcadores de resorción NTX y  $\alpha\alpha$ CTX y de formación FAO. Además se ha evaluado la evolución y el valor pronóstico de los niveles de las células tumorales circulantes (CTC).

El marcador de resorción NTX es un producto de la degradación del colágeno formado por dos telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I unidos a un tercer péptido del dominio helicoidal de otro colágeno de tipo I [43]. Este marcador ha demostrado una gran sensibilidad a la hora de detectar metástasis óseas [60,66]. En este trabajo además se ha utilizado un ensayo que detecta los niveles del marcador  $\alpha\alpha$ CTX, un producto de la degradación del

colágeno formado por dos cadenas  $\alpha$  unidas por puentes piridinólicos, desoxipiridinólicos y otros enlaces. El  $\alpha\alpha$ CTX se origina por la degradación de colágeno recién sintetizado, debida a un remodelado óseo anómalo causado por la presencia de células metastásicas en el hueso. La fosfatasa alcalina ósea es un marcador altamente específico, ya que es liberado únicamente por osteoblastos activos, y tiene una gran sensibilidad para detectar aumentos de recambio óseo. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales que se utilizan en la determinación de esta proteína muestran una reactividad cruzada del 15% con la isoenzima hepática[39], por lo que los niveles de FAO podrían encontrarse alterados en pacientes con enfermedades hepáticas. Por ello, se excluyeron del estudio aquellas pacientes que tuviesen metástasis en el hígado. Los niveles basales medios de todos los marcadores de remodelado óseo analizados en el suero u orina de las pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas eran patológicos, lo que demuestra que hay un aumento anormal del remodelado óseo producido por la presencia de dichas lesiones óseas.

Los eventos relacionados con el esqueleto (EREs) suponen una pérdida dramática de la calidad de vida de los pacientes. La detección y el tratamiento de las metástasis óseas antes de la aparición de estos eventos podrían ayudar a preservar la calidad de vida de los pacientes y su independencia funcional. Los EREs pueden ocurrir independientemente de la apariencia radiográfica de las lesiones óseas (osteolíticas u osteoblásticas)[61]. Por todo ello, es importante la evaluación de este parámetro en los ensayos en pacientes con metástasis óseas. En nuestro caso, en el estudio en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, el estado inicial de la enfermedad fue evaluado mediante la valoración de los EREs que cada uno de ellos había sufrido antes de ser reclutados. En este caso, un 19,7% de las enfermas habían sufrido al menos un ERE antes de entrar en el estudio, a pesar de que todas ellas tenían metástasis en hueso confirmadas mediante gammagrafía.

Como se ha dicho anteriormente, en este estudio las pacientes fueron tratadas con ácido zoledrónico. Diversos trabajos han demostrado que el ácido zoledrónico retrasa significativamente la aparición de EREs en los pacientes con metástasis óseas y distintos tumores primarios: cáncer de mama, cáncer de próstata, de pulmón y otros tumores sólidos [47,85,87]. Nuestros resultados muestran que la administración del ácido zoledrónico consigue frenar la aparición de nuevos EREs, debido a que este fármaco está inhibiendo la

resorción ósea inducida por las células tumorales que han metastatizado en el hueso. Sin embargo, no es capaz de evitar la progresión de la enfermedad, lo cual refleja que este fármaco no es capaz de frenar completamente la aparición de nuevas lesiones o el aumento de la extensión de las ya existentes.

Uno de los objetivos del trabajo realizado en pacientes fue evaluar la evolución de los marcadores de remodelado óseo durante el estudio. Como se ha dicho anteriormente, los niveles medios en la visita basal de todos los biomarcadores analizados eran patológicos, lo que refleja que se produce un aumento en el grado de recambio óseo debido a la presencia de células metastásicas en el hueso. El tratamiento con ácido zoledrónico normalizó los niveles de NTX y  $\alpha\alpha$ CTX desde la primera visita del estudio (V1). Se observó una reducción, aproximadamente, del 35% en el porcentaje de pacientes con niveles patológicos de NTX y  $\alpha\alpha$ CTX entre V0 y V1. Resultados similares se encontraron en el literatura[15,67,70]. Por otro lado, se vio que los niveles medios de FAO eran muy altos al inicio del estudio. A pesar de la disminución significativa de los niveles de este marcador de formación ósea, el tratamiento con ácido zoledrónico no consiguió que los valores medios de FAO llegasen a encontrarse dentro su rango de normalidad.

Dado que en la visita basal todos los pacientes presentaban metástasis óseas y ninguno de ellos estaba recibiendo ningún tipo de tratamiento dirigido hacia el hueso, los niveles de los marcadores de remodelado óseo deberían encontrarse alterados en todas las pacientes. El cáncer de mama tiende a realizar metástasis osteolíticas, por lo que cabría esperar una mejor correlación de los marcadores de resorción que de los de formación con la extensión de la enfermedad. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que el marcador FAO, de formación ósea, era el que se encontraba elevado en un mayor porcentaje de pacientes en la visita basal. En trabajos anteriores de otros autores, se ha visto que el marcador  $\alpha\alpha$ CTX muestra una fuerte correlación con el número y extensión de las metástasis en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas[16]. A pesar de ello, nosotros hemos visto que este marcador es el que se encontraba elevado en un menor porcentaje de pacientes al principio del estudio con respecto a los otros marcadores de remodelado estudiados. Por otra parte, tal y como esperábamos dado el mecanismo de acción del ácido zoledrónico, el porcentaje de pacientes con niveles de marcadores de resorción ósea patológicos desciende drásticamente desde la primera visita

del estudio. Esto es signo de que el proceso de resorción está siendo menor, gracias al ácido zoledrónico, lo cual resulta beneficioso para los pacientes con metástasis óseas. Aunque la determinación de estos marcadores puede ser útil para conocer si ha habido respuesta al tratamiento antirresortivo, no se pueden utilizar para conocer la extensión de las metástasis una vez ha comenzado dicho tratamiento. Para seguir el desarrollo de la enfermedad, parece que es más útil la determinación del marcador FAO, que en nuestro estudio se mantuvo elevado en la mayoría de los pacientes a lo largo de todo el estudio (más del 40% de los pacientes mostraron niveles elevados de este marcador).

A continuación, se llevó a cabo un estudio estadístico exhaustivo, en el que se evaluó el valor pronóstico de los marcadores de remodelado óseo. Estudios previos (sobre todo realizados en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas, y en pacientes con mieloma múltiple) sugieren que los marcadores de remodelado óseo se correlacionan con la presencia, extensión y pronóstico de las metástasis, así como con la aparición de EREs, progresión de la enfermedad y muerte, en pacientes afectados de dichas enfermedades[63,64,69].

Nuestros resultados mostraron que los niveles basales de NTX elevados, niveles de este marcador no normalizados en V1 (después de 3 meses de tratamiento con ácido zoledrónico) o con un valor  $V1/V0 > 0,24$  (es decir, una disminución en el nivel de NTX en  $V1 < 24\%$  con respecto a los niveles basales) se asociaron con riesgo de muerte dos veces mayor al que tenían los pacientes con niveles normales NTX en V0, que normalizaron los niveles de este marcador o con un valor de  $V1/V0 < 0,24$ . Lipton y cols[68,70] describieron que pacientes con cáncer de mama que tenía niveles basales de NTX bajos o que se normalizaban después de 3 meses de tratamiento, mostraban una reducción significativa de entre el 48% y 55% en el riesgo de muerte. En nuestro trabajo, no se encontró asociación entre el marcador NTX y la progresión de la enfermedad, aunque en un estudio realizado por Coleman y cols[19] se observó que el riesgo de progresión de la enfermedad era el doble, si los niveles basales de NTX eran elevados.

El uso de  $\alpha\text{CTX}$  como biomarcador en el cáncer de mama metastásico está aumentando en la práctica clínica. Este marcador de resorción posee una alta sensibilidad a la hora de reflejar las irregularidades en el grado de remodelado óseo asociadas a las metástasis[16,17,38] y, por ello, ha sido utilizado en estudios sobre el cáncer de mama metastásico[16,62]. A pesar de

esto, en nuestro trabajo no hemos encontrado asociación entre  $\alpha\alpha$ CTX y la mortalidad o la progresión de la enfermedad. Las diferencias en cuanto a la sensibilidad entre NTX y  $\alpha\alpha$ CTX puede ser debidas a: 1) Diferentes situaciones basales pueden hacer que las respuestas de los distintos marcadores de remodelado óseo al tratamiento con ácido zoledrónico no sean similares[44]; 2) NTX es un producto de la degradación del colágeno tanto antiguo como recién sintetizado, mientras que  $\alpha\alpha$ CTX procede únicamente de colágeno recientemente sintetizado[16,36]; 3)  $\alpha\alpha$ CTX es generado por la digestión del colágeno mediada por la catepsina K, la cual es secretada por osteoclastos maduros, sin embargo NTX se genera tanto por la catepsina K como por metaloproteinasas secretadas en un ambiente metastásico[45].

El marcador de formación FAO fue el que mostró una mayor capacidad predictiva en nuestro estudio. Los pacientes con niveles patológicos de FAO al inicio del estudio o en V1 tenían un riesgo de muerte cinco y tres veces mayor, respectivamente, que los pacientes con niveles normales de este marcador. Además, la FAO fue también el único biomarcador asociado significativamente con la progresión de la enfermedad, aumentando el riesgo de progresión en 2 veces cuando los niveles basales de FAO eran mayores de 26,9 $\mu$ g/L.

Dado que los niveles marcadores de remodelado óseo en V0 se correlacionaron significativamente con los niveles de V1, se puede deducir que sólo los niveles iniciales predicen la mortalidad. De hecho, un nivel V1/V0 FAO > 1,08 $\mu$ g/L no se asoció con un aumento de la mortalidad, mientras que los niveles basales elevados sí lo hicieron. Por otro lado, niveles V1/V0 de NTX > 0,24 nM ECO/mM de creatinina se asociaron con la mortalidad, sin embargo, niveles patológicos basales de este marcador (> 80 nM ECO/mM de creatinina) no mostraron dicha asociación. Por lo tanto, en nuestras condiciones de trabajo los valores basales de FAO son predictores de la mortalidad, mientras que para NTX, los niveles tras 3 meses de tratamiento con ácido zoledrónico predicen la mortalidad de forma independiente del estado basal de dicho marcador. Además, es importante señalar que los otros tratamientos que recibieron las pacientes no pueden haber afectado a los resultados, ya que no hay diferencias en cuanto a los tratamientos sistémicos utilizados entre las pacientes con niveles altos o bajos de los marcadores de remodelado óseo.

La detección de CTC puede suponer una forma de evaluar el pronóstico de los pacientes en etapas tempranas del tratamiento del cáncer[25,74], e incluso una ayuda para el clínico a la

hora de tomar decisiones (por ejemplo, niveles elevados de CTC durante el tratamiento de la enfermedad metastásica podría sugerir el uso de una terapia más agresiva[2]). En nuestro estudio, los niveles medios de CTC fueron patológicos en todas las visitas, lo que es consistente con el hecho de que todos los pacientes, en el momento de su inclusión en el estudio, presentaban cáncer de mama diseminado. Niveles patológicos de CTCs al inicio del estudio y en V1 supusieron un mayor riesgo de muerte, dos y tres veces superior, respectivamente, que el de los pacientes con valores normales de CTC. Estudios previos han encontrado riesgos de mortalidad ligeramente más altos para los pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas que tuviese niveles patológicos de CTC ( $>5$  CTC/7,5mL de suero). En el estudio de Dawood y cols[30], en el que analizaron el número de CTC en pacientes con cáncer de mama y metástasis de nuevo diagnóstico y sin ningún tratamiento, encontraron que aquellas pacientes con CTC basales  $\geq 5$  tenían un *hazard ratio*=3,6 con respecto a la supervivencia global frente a las pacientes con CTC basales menores de 5. Por otra parte, Cristofanilli y cols[26] observaron que los pacientes con CTC  $\geq 5$  al inicio del estudio, así como en la primera visita de seguimiento, mostraron una supervivencia menor en comparación con los pacientes con CTC  $< 5$ . Curiosamente, encontraron que la supervivencia en pacientes con CTC  $< 5$  en V1 pero  $\geq 5$  al inicio del estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas con las pacientes que muestran CTC  $< 5$  en ambos momentos del estudio, lo que sugiere que cuando el paciente presentó una buena evolución entre la visita basal y V1 (CTCs  $< 5$ ), la situación de partida no tuvo un impacto importante en los resultados. En cambio, nuestros resultados muestran que la situación basal de las CTC tiene tanta importancia como la situación en V1, ya que los niveles de CTC  $\geq 5$  fueron predictores de mortalidad, tanto al inicio del estudio como en V1.

Por otra parte, no encontramos asociación entre los niveles de CTC y la progresión de la enfermedad. La población de pacientes con cáncer de mama estudiada por Cristofanilli y cols[25] sí mostró tal asociación. Sin embargo, en dicho estudio, cuando los pacientes fueron clasificados de acuerdo al tratamiento que recibían, los pacientes tratados con la terapia hormonal, inmunoterapia o ambos no mostraron asociación significativa en cuanto a la progresión de la enfermedad según los niveles de CTC, mientras que los tratados con quimioterapia sí lo hicieron.

A pesar de que los marcadores de remodelado óseo se han asociado con la morbilidad esquelética[19], en nuestro trabajo ninguno de los biomarcadores estudiados se correlacionó con la aparición de EREs. Esto podría ser debido a que sólo un pequeño número de pacientes presentó EREs a lo largo del estudio (aproximadamente un 20%) y una muestra tan pequeña podría no haber sido suficiente para encontrar diferencias significativas con suficiente poder estadístico. Actualmente, no hemos encontrado referencias disponibles sobre la relación entre las CTC y los EREs.

En este estudio se ha llevado a cabo por primera vez, un análisis de la correlación que existe entre los marcadores de remodelado óseo y las CTC en pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas. NTX mostró una correlación significativa con los niveles de CTC desde el inicio hasta 6 meses después del inicio del tratamiento con ácido zoledrónico. Por otra parte,  $\alpha\alpha$ CTX mostró los peores resultados, ya que únicamente se correlacionaron sus valores con los de CTC en V0. Se encontró que la FAO se correlaciona con los niveles de CTC en todas las visitas del estudio. Este hecho se debe probablemente a que la acción del antirresortivo ácido zoledrónico afecta principalmente a los niveles de NTX y de  $\alpha\alpha$ CTX (marcadores de resorción ósea), y no a la FAO, que es un marcador de la formación ósea. Hemos observado que los cambios en los marcadores de remodelado óseo se correlacionan con los niveles de CTC, las cuales, en principio, no parecen verse directamente afectadas por el tratamiento con bifosfonatos. Este hecho puede ser una consecuencia del efecto antineoplásico del ácido zoledrónico que se viene discutiendo en los últimos años y que se ha comentado anteriormente en esta tesis[7,32,37,46]. El análisis de la correlación existente entre los marcadores de remodelado óseo y las células tumorales circulantes añade datos adicionales sobre la utilidad clínica de dichos marcadores y su uso en seguimiento de la enfermedad metastásica ósea.

El recuento de CTC es un ensayo mínimamente invasivo, rápido y preciso. Como los métodos para el enriquecimiento, la detección y el recuento de CTC siguen mejorando [21], y ya que las CTC pueden ser cuantificadas antes de la detección de metástasis óseas por técnicas de imagen, los niveles de CTC podrían ser utilizados como un marcador muy útil para el clínico, en el seguimiento de la evolución del cáncer de mama.









1. En un modelo tumoral en ratones atímicos, inoculados con células A549, se produce un aumento de la carga tumoral en el hueso con el tiempo, así como un aumento de las lesiones óseas. Dichas lesiones son de tipo osteolítico. Los niveles de los marcadores de remodelado óseo tanto de formación (BGP y PINP) como de resorción ( $\alpha$ CTX y FTR5b) aumentan como consecuencia de la presencia de células tumorales en el hueso.
2. El tratamiento con ácido zoledrónico es capaz de disminuir la carga tumoral en el hueso y el área de afectación ósea, así como los niveles de todos los marcadores de remodelado óseo.
3. Los marcadores de resorción ( $\alpha$ CTX y FTR5b) se correlacionan significativamente con la bioluminiscencia y con el área de osteolisis veintiún días después de la inoculación de las células tumorales. Los marcadores de formación ósea (BGP y PINP) sólo se correlacionaron con el área de osteolisis. Esto es debido posiblemente a la naturaleza osteolítica de las células tumorales estudiadas.
4. Se han identificado 5 miRNAs expresados diferencialmente en el suero de los ratones tumorales con respecto a los sanos, de los cuales dos, miR497 y especialmente miR326, se correlacionaron significativamente con la carga tumoral, por lo que podrían ser útiles en el seguimiento del avance de la enfermedad metastásica ósea.
5. Los niveles de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo se encuentran significativamente elevados en las pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas con respecto a las mujeres sanas, siendo mayor, en nuestro estudio, el porcentaje de pacientes que presentaba niveles anormalmente elevados de FAO.
6. El tratamiento con ácido zoledrónico disminuye significativamente los niveles de todos los marcadores de remodelado óseo, alcanzándose valores normales de los mismos al cabo de tres meses, en el caso del  $\alpha$ CTX y del NTX, pero no de la FAO, que se mantiene por encima de la normalidad.
7. Los niveles de CTCs en los pacientes con cáncer de mama y metástasis óseas se encontraron elevados a lo largo de todo el estudio, sin que el tratamiento con ácido zoledrónico afectara a los mismos. Se observó una correlación significativa entre los marcadores de remodelado óseo estudiados y las CTCs en situación basal, perdiéndose dicha correlación tras el tratamiento con

ácido zoledrónico y siendo la FAO el único marcador que la mantiene a lo largo de todo el estudio.

8. Los niveles de los marcadores de remodelado NTX y FAO, así como el número de CTC, se asocian significativamente con un aumento del riesgo de muerte tanto en la visita basal como tras tres meses de tratamiento con ácido zoledrónico. Los niveles elevados de FAO en la visita basal son los que mejor valor pronóstico muestran, siendo en este caso el riesgo de muerte 5 veces mayor que el de las pacientes con niveles normales de dicho marcador.

9. Los niveles basales de FAO elevados fueron los únicos que se asociaron significativamente con un mayor riesgo de progresión de la enfermedad.

**10. Los resultados de este trabajo muestran que los marcadores de remodelado óseo las CTC y los miRNAs pueden constituir una herramienta muy útil para el clínico en el seguimiento de la progresión de la enfermedad metastásica ósea, la valoración del pronóstico de las pacientes y el análisis de la respuesta a los tratamientos antirresortivos.**





- 1 Ajit SK. Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules. *Sensors (Basel)* 2012;**12**:3359–69.
- 2 Alemar J, Schuur ER. Progress in using circulating tumor cell information to improve metastatic breast cancer therapy. *J Oncol* 2013;**2013**:702732.
- 3 Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, Tibbe AGJ, Uhr JW, Terstappen LWMM. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Non. 2005;:6897–904.
- 4 Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper MA. Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. *J Carcinog* 2011;**10**:2.
- 5 Amadori A, Rossi E, Zamarchi R, Carli P, Pastorelli D, Jirillo A. Circulating and disseminated tumor cells in the clinical management of breast cancer patients: unanswered questions. *Oncology* 2009;**76**:375–86.
- 6 Bendre MS, Gaddy-Kurten D, Mon-Foote T, Akel NS, Skinner RA, Nicholas RW, Suva LJ. Expression of interleukin 8 and not parathyroid hormone-related protein by human breast cancer cells correlates with bone metastasis in vivo. *Cancer Res* 2002;**62**:5571–9.
- 7 Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Mignetto S, Ebtino FH, Colombel M, Delmas P, Delaissé JM, Clézardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;**60**:2949–54.
- 8 Boudreau N, Myers C. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Res* 2003;**5**:140–6.

- 9 Brasso K, Christensen IJ, Johansen JS, Teisner B, Garnero P, Price P a, Iversen P. Prognostic value of PINP, bone alkaline phosphatase, CTX-I, and YKL-40 in patients with metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2006;**66**:503–13.
- 10 Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M, Lee K-A, Zheng M, Hei Y-J, Coleman RE. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:59–69.
- 11 Buck DW, Dumanian G a. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 2012;**129**:1314–20.
- 12 Buijs JT, van der Pluijm G. Osteotropic cancers: from primary tumor to bone. *Cancer Lett* 2009;**273**:177–93.
- 13 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**:15524–9.
- 14 Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 1996;**17**:333–68.
- 15 Cloos PAC, Christgau S, Lyubimova N, Body J-J, Qvist P, Christiansen C. Breast cancer patients with bone metastases are characterised by increased levels of nonisomerised type I collagen fragments. *Breast Cancer Res* 2003;**5**:R103–9.
- 16 Cloos PAC, Christgau S, Lyubimova N, Body J-J, Qvist P, Christiansen C. Breast cancer patients with bone metastases are characterised by increased levels of nonisomerised type I collagen fragments. *Breast Cancer Res* 2003;**5**:R103–9.
- 17 Cloos PAC, Lyubimova N, Solberg H, Qvist P, Christiansen C, Byrjalsen I, Christgau S. An immunoassay for measuring fragments of newly synthesized collagen type I produced during metastatic invasion of bone. *Clin Lab* 2004;**50**:279–89.



- 
- 18 Coleman R, Brown J, Terpos E, Lipton A, Smith MR, Cook R, Major P. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. *Cancer Treat Rev* 2008;**34**:629–39.
  - 19 Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee K-A, Smith M, Saad F, Zheng M, Hei YJ, Seaman J, Cook R. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J Clin Oncol* 2005;**23**:4925–35.
  - 20 Coleman RE. Adjuvant bone-targeted therapy to prevent metastasis: lessons from the AZURE study. *Curr Opin Support Palliat Care* 2012;**6**:322–9.
  - 21 Coleman RE. Bisphosphonates: clinical experience. *Oncologist* 2004;**9 Suppl 4**:14–27.
  - 22 Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin cancer Res* 2006;**12**:6243s–6249s.
  - 23 Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin cancer Res* 2006;**12**:6243s–6249s.
  - 24 Coleman RE. Skeletal complications of malignancy. *Cancer* 1997;**80**:1588–94.
  - 25 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle G V, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;**351**:781–91.
  - 26 Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle G V, Allard WJ, Terstappen LWMM, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;**351**:781–91.
  - 27 Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle G V, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche H a, Hortobagyi GN, Terstappen LWMM. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;**23**:1420–30.

- 28 Croce CM, Calin GA. miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 2005;**122**:6–7.
- 29 Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta )-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *J Biol Chem* 2002;**277**:21352–60.
- 30 Dawood S, Broglio K, Valero V, Reuben J, Handy B, Islam R, Jackson S, Hortobagyi GN, Fritsche H, Cristofanilli M. Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: from prognostic stratification to modification of the staging system? *Cancer* 2008;**113**:2422–30.
- 31 Demers L. Bone-specific alkaline phosphatase. In: Eastell R, Baumann M, Hoyle N, Wiczorek L, eds. *Bone markers: biochemical and clinical perspectives*. Londres: Martin Dunitz 2001. 57–65.
- 32 Denoyelle C, Hong L, Vannier J-P, Soria J, Soria C. New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *Br J Cancer* 2003;**88**:1631–40.
- 33 Deroose CM, De A, Loening AM, Chow PL, Ray P, Chatziioannou AF, Gambhir SS. Multimodality imaging of tumor xenografts and metastases in mice with combined small-animal PET, small-animal CT, and bioluminescence imaging. *J Nucl Med* 2007;**48**:295–303.
- 34 Eisenhauer E a, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009;**45**:228–47.
- 35 Fan K, Peng CF. Predicting the probability of bone metastasis through histological grading of prostate carcinoma: a retrospective correlative analysis of 81 autopsy cases with antemortem transurethral resection specimen. *J Urol* 1983;**130**:708–11.

- 
- 36 Fledelius C, Johnsen AH, Cloos PA, Bonde M, Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. Identification of a beta-isomerized Asp-Gly sequence within the C-terminal telopeptide (alpha1) region. *J Biol Chem* 1997;**272**:9755–63.
- 37 Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 2000;**15**:2211–21.
- 38 Garnero P, Buchs N, Zekri J, Rizzoli R, Coleman RE, Delmas PD. Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;**82**:858–64.
- 39 Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**77**:1046–53.
- 40 Garnero P, Ferreras M, Karsdal M a, Nicamhlaoibh R, Risteli J, Borel O, Qvist P, Delmas PD, Foged NT, Delaissé JM. The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res* 2003;**18**:859–67.
- 41 Giuliano M, Giordano A, Jackson S, Hess KR, De Giorgi U, Mego M, Handy BC, Ueno NT, Alvarez RH, De Laurentiis M, De Placido S, Valero V, Hortobagyi GN, Reuben JM, Cristofanilli M. Circulating tumor cells as prognostic and predictive markers in metastatic breast cancer patients receiving first-line systemic treatment. *Breast Cancer Res* 2011;**13**:R67.
- 42 Gundberg CM. Osteocalcin. In: Eastell R, Baumann M, Hoyle N, Wiczorek Eastell R, eds. *Bone markers: biochemical and clinical perspectives*. Londres: Martin Dunitz 2001. 65–73.
- 43 Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992;**7**:1251–8.

- 44 Herrmann M, Seibel MJ, Seibel M. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;**393**:57–75.
- 45 Herrmann M, Seibel MJ, Seibel M. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;**393**:57–75.
- 46 Hirbe AC, Roelofs AJ, Floyd DH, Deng H, Becker SN, Lanigan LG, Apicelli AJ, Xu Z, Prior JL, Eagleton MC, Piwnica-Worms D, Rogers MJ, Weilbaecher K. The bisphosphonate zoledronic acid decreases tumor growth in bone in mice with defective osteoclasts. *Bone* 2009;**44**:908–16.
- 47 Hirsh V, Tchekmedyian NS, Rosen LS, Zheng M, Hei Y-J. Clinical benefit of zoledronic acid in patients with lung cancer and other solid tumors: analysis based on history of skeletal complications. *Clin Lung Cancer* 2004;**6**:170–4.
- 48 Hofbauer LC, Kühne C a, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;**4**:268–75.
- 49 Hong B, Zu Y. Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics* 2013;**3**:377–94.
- 50 Huang Q, Ouyang X. Biochemical-markers for the diagnosis of bone metastasis: a clinical review. *Cancer Epidemiol* 2012;**36**:94–8.
- 51 Hung T-T, Chan J, Russell PJ, Power C a. Zoledronic acid preserves bone structure and increases survival but does not limit tumour incidence in a prostate cancer bone metastasis model. *PLoS One* 2011;**6**:e19389.
- 52 Ibrahim T, Flamini E, Mercatali L, Sacanna E, Serra P, Amadori D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer* 2010;**116**:1406–18.

- 
- 53 Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H a, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 2001;**84**:1126–34.
- 54 Käkönen S-M, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer* 2003;**97**:834–9.
- 55 Käkönen S-M, Mundy GR. Mechanisms of osteolytic bone metastases in breast carcinoma. *Cancer* 2003;**97**:834–9.
- 56 Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise T a, Massagué J. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 2003;**3**:537–49.
- 57 Kardamakis D, Vassiliou V, Chow E. *Bone Metastases. A translational and clinical approach*. Netherlands: Springer Science Bussiness Media LLC 2009.
- 58 Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011;**11**:849–64.
- 59 Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells* 2005;**19**:1–15.
- 60 De la Piedra C, Castro-Errecaborde N-A, Traba ML, Méndez-Dávila C, García-Moreno C, de Acuña LR, Rodríguez-Molina J. Bone remodeling markers in the detection of bone metastases in prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2003;**331**:45–53.
- 61 Langer C, Hirsh V. Skeletal morbidity in lung cancer patients with bone metastases: demonstrating the need for early diagnosis and treatment with bisphosphonates. *Lung Cancer* 2010;**67**:4–11.
- 62 Leeming DJ, Delling G, Koizumi M, Henriksen K, Karsdal MA, Li B, Qvist P, Tankó LB, Byrjalsen I. Alpha CTX as a biomarker of skeletal invasion of breast cancer:

- immunolocalization and the load dependency of urinary excretion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;**15**:1392–5.
- 63 Leeming DJ, Koizumi M, Byrjalsen I, Li B, Qvist P, Tankó LB. The relative use of eight collagenous and noncollagenous markers for diagnosis of skeletal metastases in breast, prostate, or lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;**15**:32–8.
- 64 Lein M, Miller K, Wirth M, Weissbach L, May C, Schmidt K, Haus U, Schrader M, Jung K. Bone turnover markers as predictive tools for skeletal complications in men with metastatic prostate cancer treated with zoledronic acid. *Prostate* 2009;**69**:624–32.
- 65 Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg H-U, Weissbach L, Schmidt K, Haus U, Stephan C, Meissner S, Loening S a, Jung K. Serial markers of bone turnover in men with metastatic prostate cancer treated with zoledronic Acid for detection of bone metastases progression. *Eur Urol* 2007;**52**:1381–7.
- 66 Lipton a, Cook R, Brown J, Body JJ, Smith M, Coleman R. Skeletal-related events and clinical outcomes in patients with bone metastases and normal levels of osteolysis: exploratory analyses. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2013;**25**:217–26.
- 67 Lipton A, Cook R, Saad F, Major P, Garnero P, Terpos E, Brown JE, Coleman RE. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. *Cancer* 2008;**113**:193–201.
- 68 Lipton A, Cook R, Saad F, Major P, Garnero P, Terpos E, Brown JE, Coleman RE. Normalization of bone markers is associated with improved survival in patients with bone metastases from solid tumors and elevated bone resorption receiving zoledronic acid. *Cancer* 2008;**113**:193–201.
- 69 Lipton A, Cook RJ, Major P, Smith MR, Coleman RE. Zoledronic acid and survival in breast cancer patients with bone metastases and elevated markers of osteoclast activity. *Oncologist* 2007;**12**:1035–43.

- 
- 70 Lipton A, Cook RJ, Major P, Smith MR, Coleman RE. Zoledronic acid and survival in breast cancer patients with bone metastases and elevated markers of osteoclast activity. *Oncologist* 2007;**12**:1035–43.
- 71 Luis-Ravelo D, Antón I, Vicent S, Hernández I, Valencia K, Zanduetta C, Martínez-Canarias S, Gúrpide A, Lecanda F. Tumor-stromal interactions of the bone microenvironment: in vitro findings and potential in vivo relevance in metastatic lung cancer models. *Clin Exp Metastasis* 2011;**28**:779–91.
- 72 Ma Y-G, Liu W-C, Dong S, Du C, Wang X-J, Li J-S, Xie X-P, Wu L, Ma D-C, Yu Z-B, Xie M-J. Activation of BK(Ca) channels in zoledronic acid-induced apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells. *PLoS One* 2012;**7**:e37451.
- 73 Major PP, Cook RJ, Chen B-L, Zheng M. Survival-adjusted multiple-event analysis for the evaluation of treatment effects of zoledronic Acid in patients with bone metastases from solid tumors. *Support Cancer Ther* 2005;**2**:234–40.
- 74 Miller MC, Doyle G V, Terstappen LWMM. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol* 2010;**2010**:617421.
- 75 Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:584–93.
- 76 Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, Mangood A, Russell RGG, Ebetino FH. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006;**38**:617–27.
- 77 Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:293–302.
- 78 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989;**8**:98–101.

- 79 Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T, Ivanova A, Ageyeva L, Tourkova V, Balatoni J, Bornmann W, Blasberg R, Gelovani Tjuvajev J. A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;**31**:740–51.
- 80 Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:285–93.
- 81 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;**14**:1902–10.
- 82 Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;**350**:1655–64.
- 83 Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *Discov Med* 2004;**4**:144–8.
- 84 Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, Apffelstaedt J, Hussein MA, Coleman RE, Reitsma DJ, Chen B-L, Seaman JJ. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003;**98**:1735–44.
- 85 Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, De Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seaman J. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial. *Cancer* 2004;**100**:2613–21.
- 86 Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, LeRoy BE, Mandl S, Contag CH. Animal models of bone metastasis. *Cancer* 2003;**97**:748–57.
- 87 Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M. Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004;**96**:879–82.



- 
- 88 Schech AJ, Kazi A a, Gilani R a, Brodie AH. Zoledronic acid reverses the epithelial-mesenchymal transition and inhibits self-renewal of breast cancer cells through inactivation of NF- $\kappa$ B. *Mol Cancer Ther* 2013;**12**:1356–66.
- 89 Senaratne SG, Mansi JL, Colston KW. The bisphosphonate zoledronic acid impairs membrane localisation and induces cytochrome c release in breast cancer cells. 2002;:1479–86.
- 90 Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2000;**82**:1459–68.
- 91 Theriault RL, Theriault RL. Biology of bone metastases. *Cancer Control* 2012;**19**:92–101.
- 92 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**:442–54.
- 93 Verdijk R, Franke HR, Wolbers F, Vermes I. Differential effects of bisphosphonates on breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 2007;**246**:308–12.
- 94 Weber K, Kominsky S. Concepts and Surgical Treatment of Metastatic Bone Disease. In: C.Rosen, ed. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Iowa: : Wiley-Blackwell 2013. 760–5.
- 95 Wicha MS, Hayes DF. Circulating tumor cells: not all detected cells are bad and not all bad cells are detected. *J Clin Oncol* 2011;**29**:1508–11.
- 96 Wittmann J, Jäck H-M. Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 2010;**1806**:200–7.
- 97 Wu TT, Sikes RA, Cui Q, Thalmann GN, Kao C, Murphy CF, Yang H, Zhau HE, Balian G, Chung LW. Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int J Cancer* 1998;**77**:887–94.

- 98 Yang T-Y, Chang G-C, Chen K-C, Hung H-W, Hsu K-H, Sheu G-T, Hsu S-L. Sustained activation of ERK and Cdk2/cyclin-A signaling pathway by pemetrexed leading to S-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Eur J Pharmacol* 2011;**663**:17–26.
- 99 Yu H-HM, Tsai Y-Y, Hoffe SE. Overview of diagnosis and management of metastatic disease to bone. *Cancer Control* 2012;**19**:84–91.
- 100 Zwolak P, Dudek AZ. Antineoplastic activity of zoledronic acid and denosumab. *Anticancer Res* 2013;**33**:2981–8.

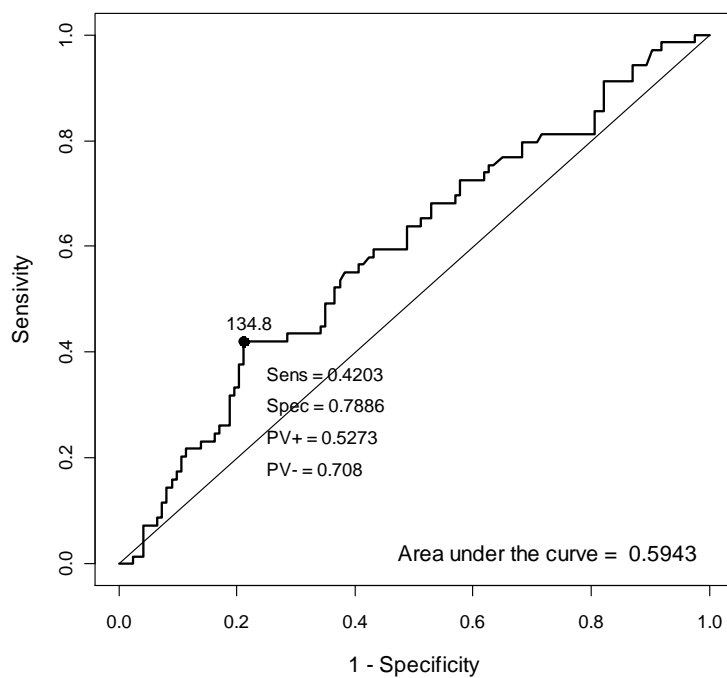




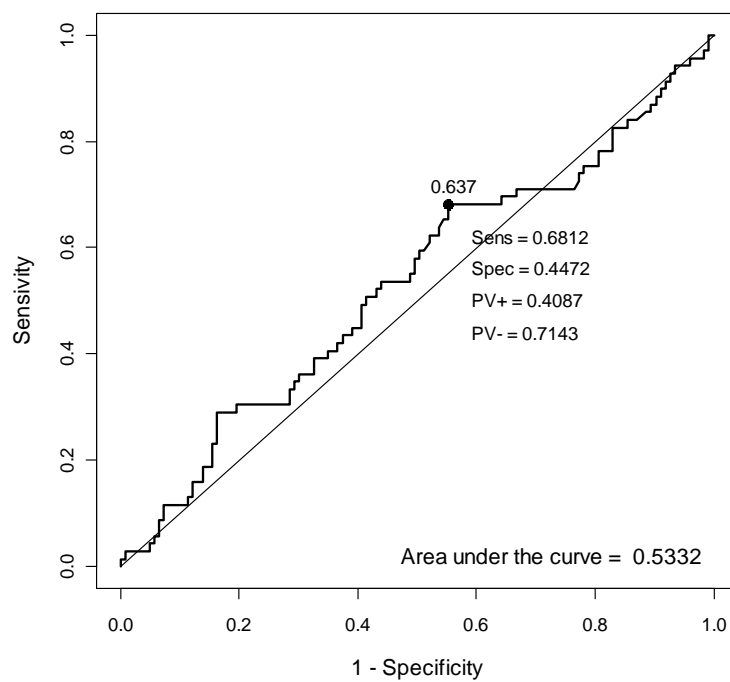
## I. ANÁLISIS MORTALIDAD

### I.1. Curvas ROC según valores basales

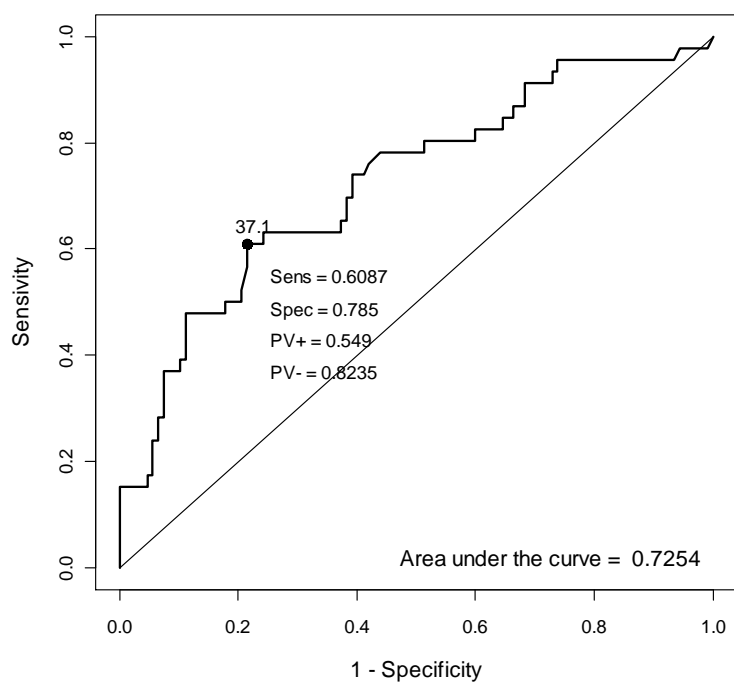
NTX



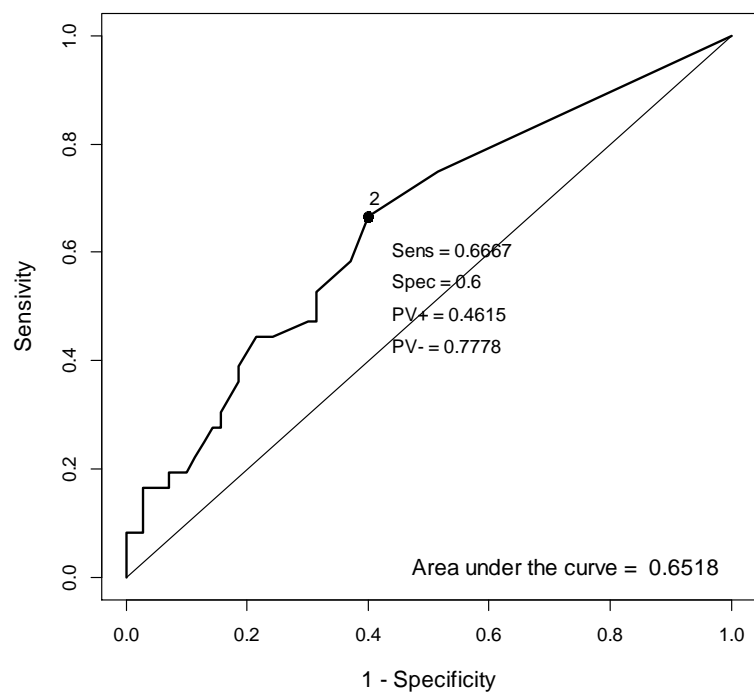
CTX



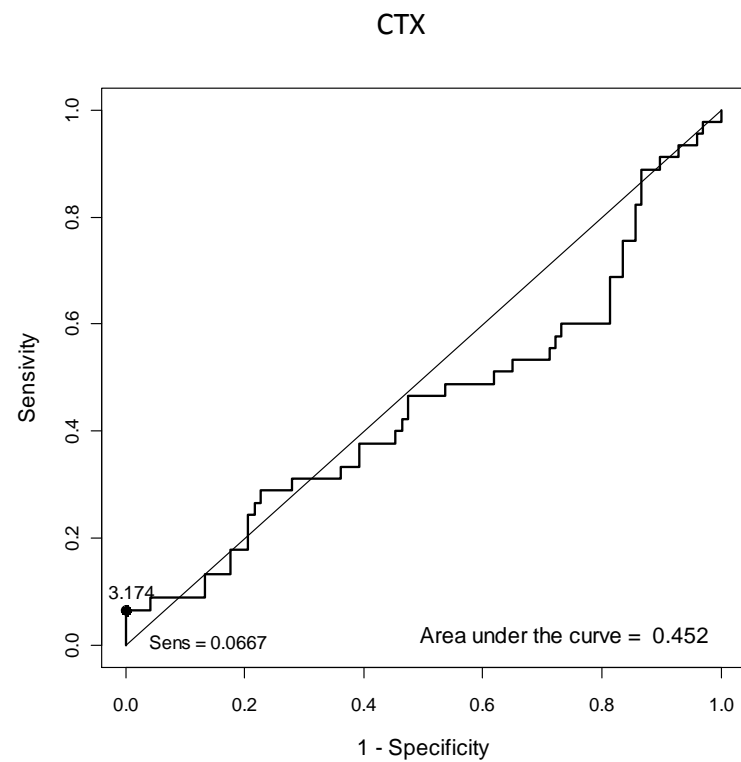
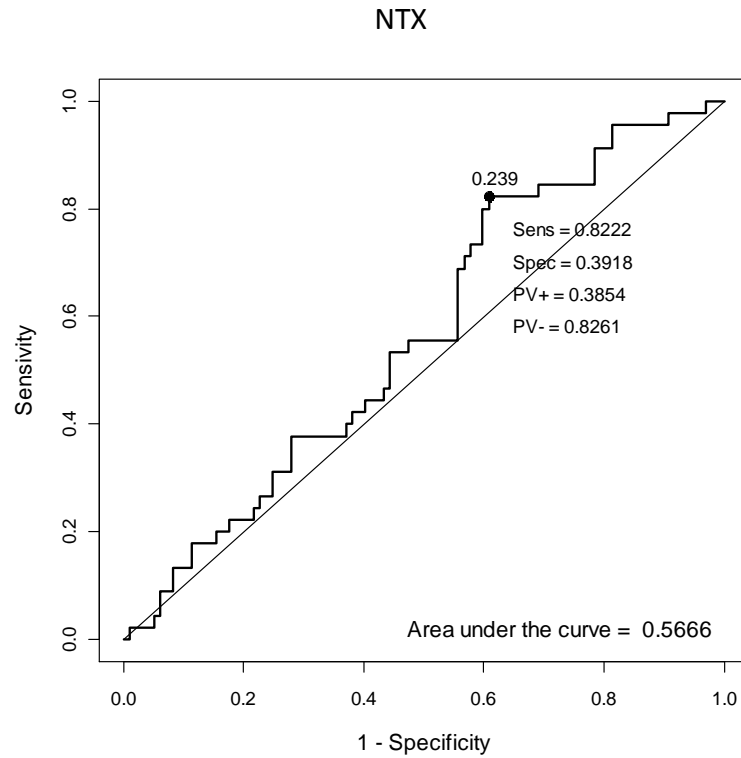
### FAO

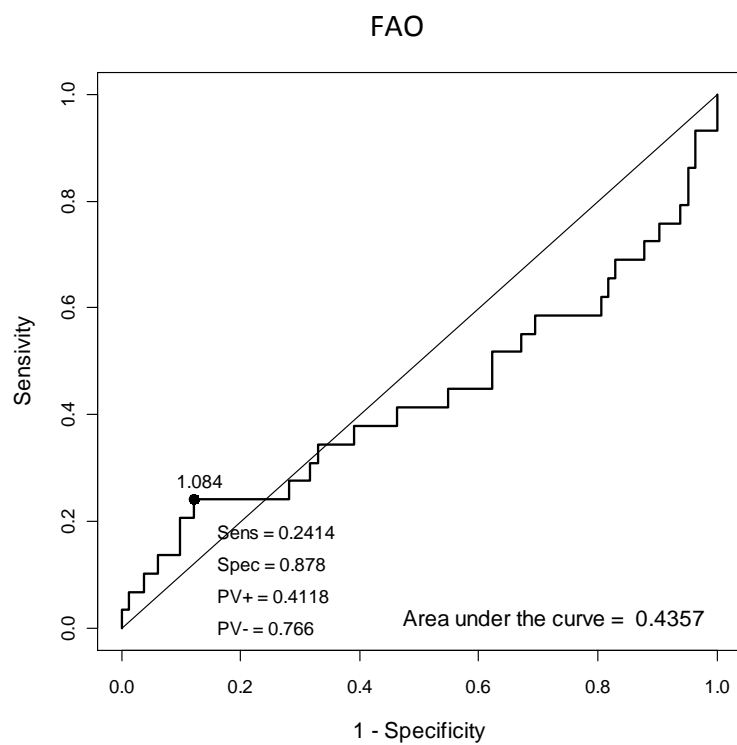


### CTC



## I.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal



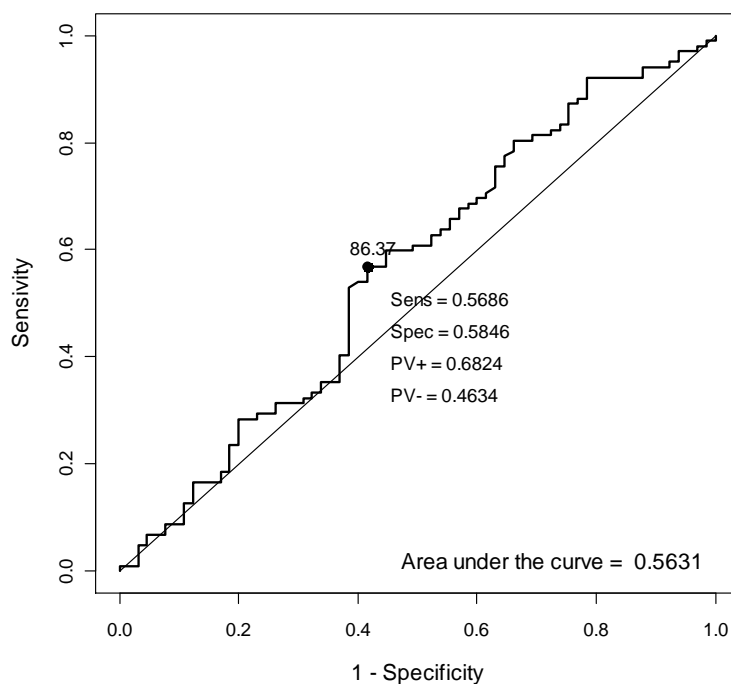




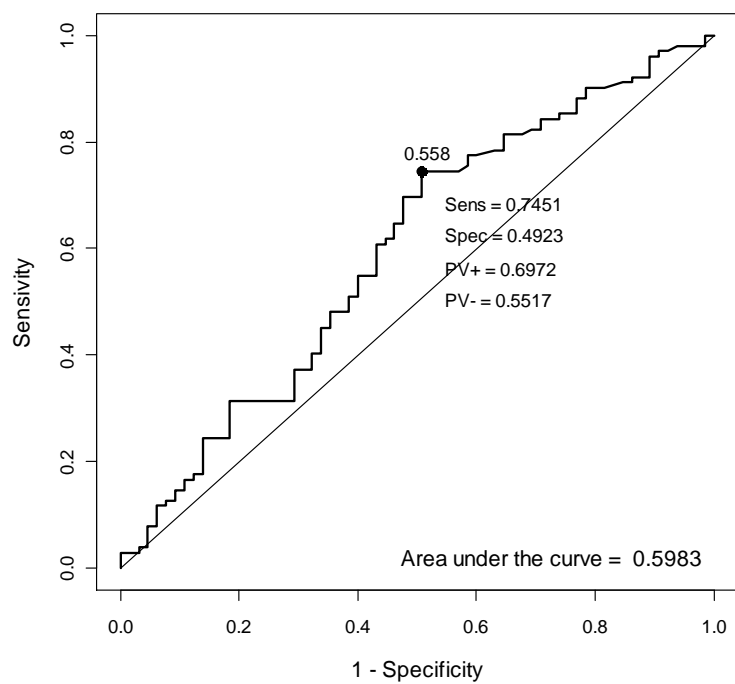
## II. ANÁLISIS PROGRESIÓN

### II.1. Curvas ROC según valores basales

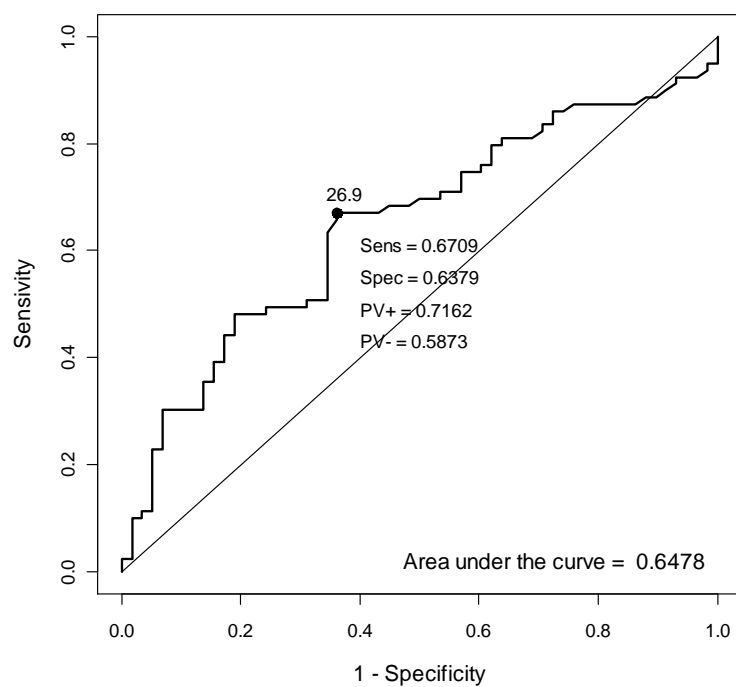
NTX



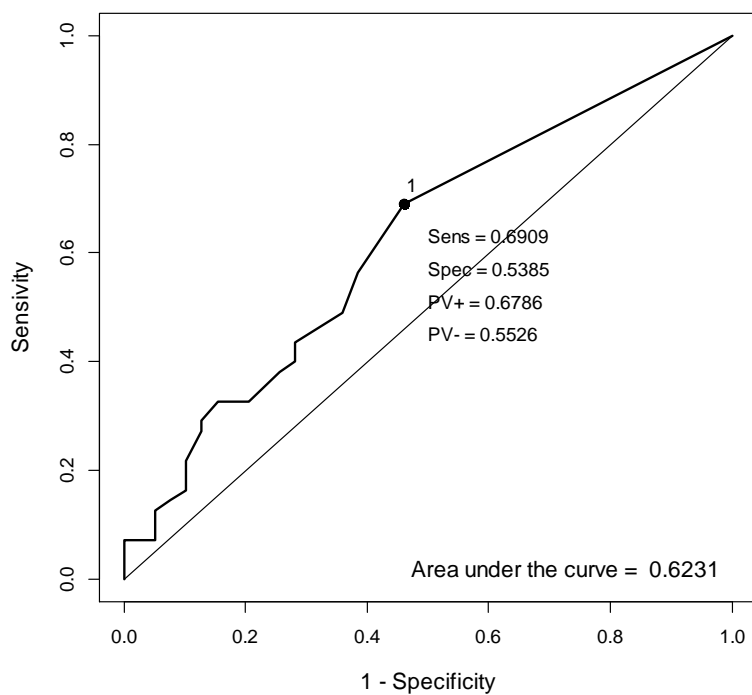
CTX



### FAO

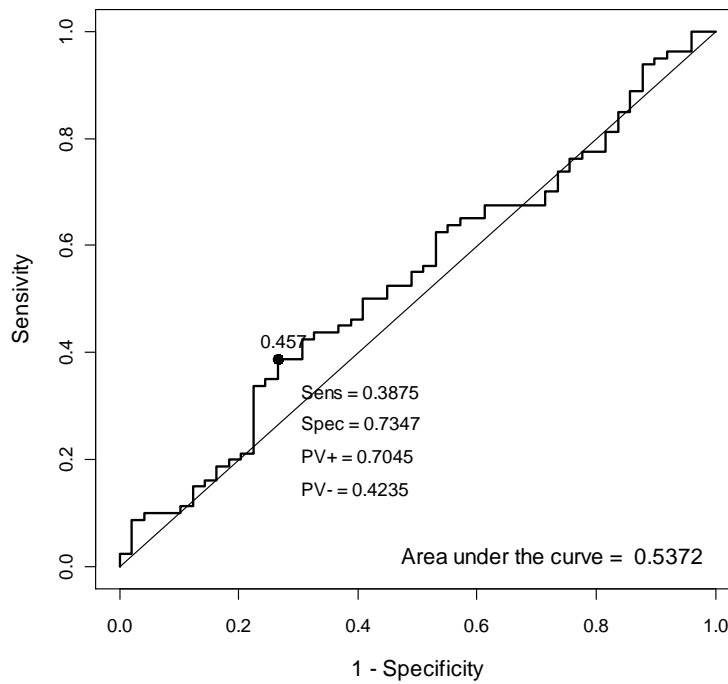


### CTC

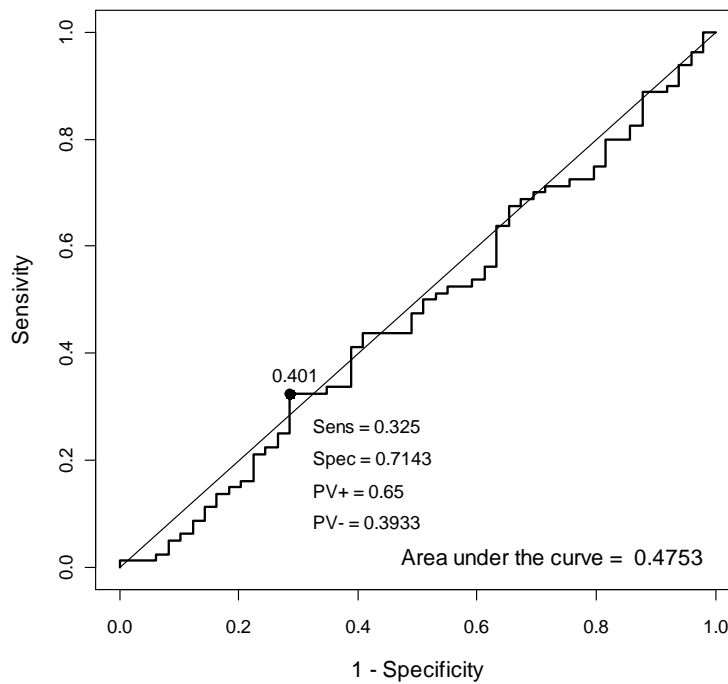


## II.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal

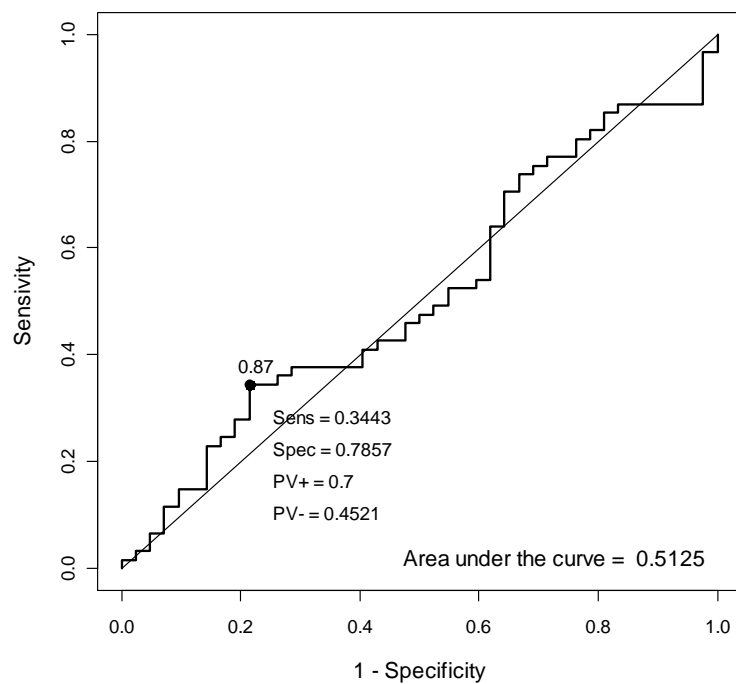
**NTX**



**CTX**

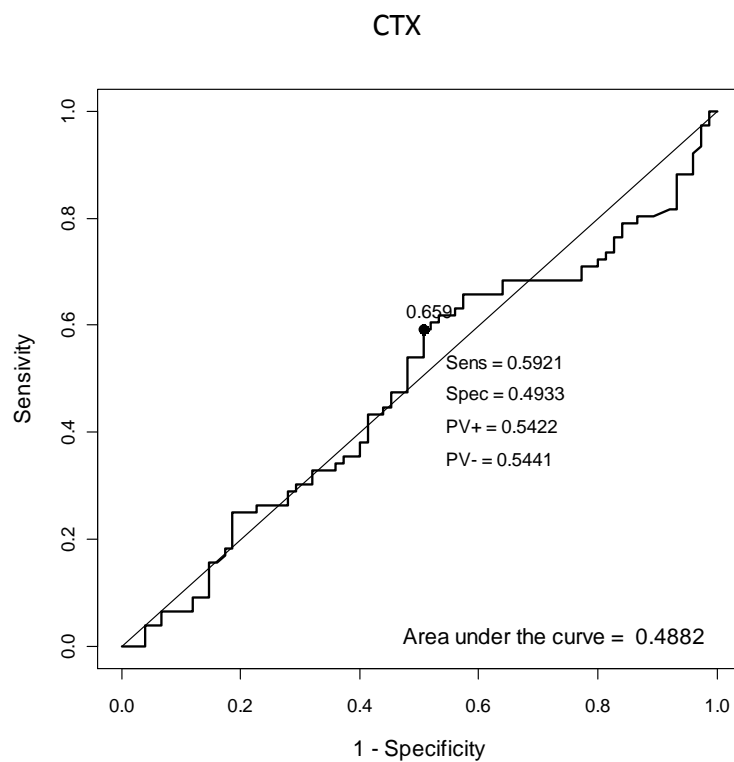
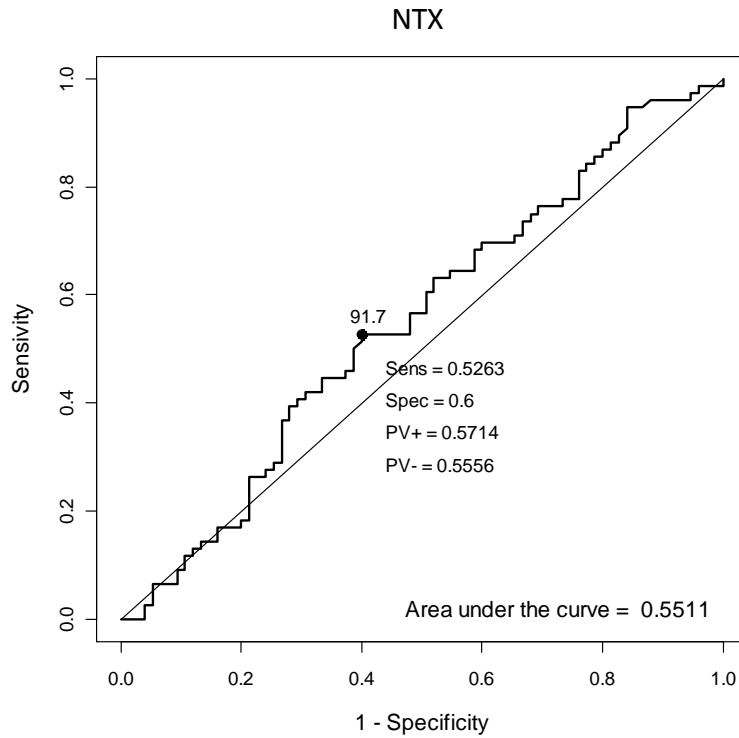


### FAO

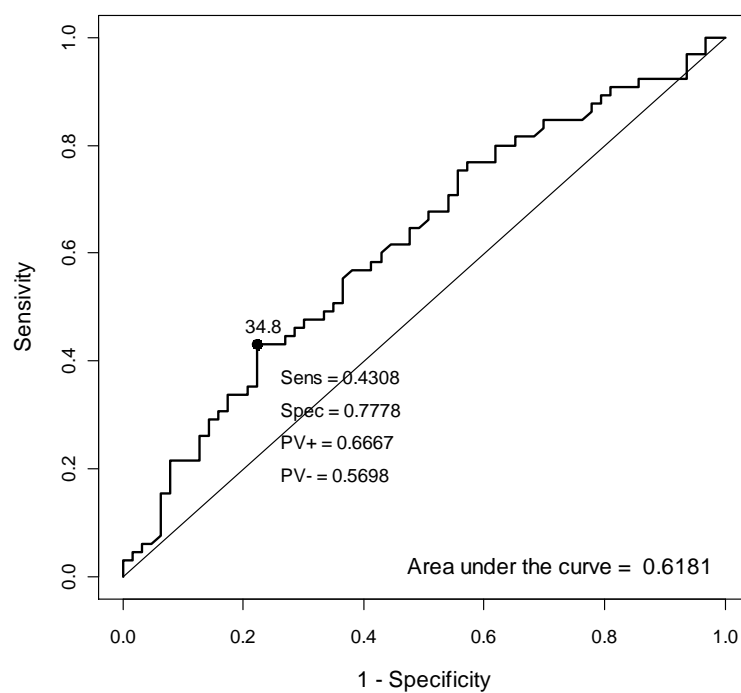


### III. Análisis EREs

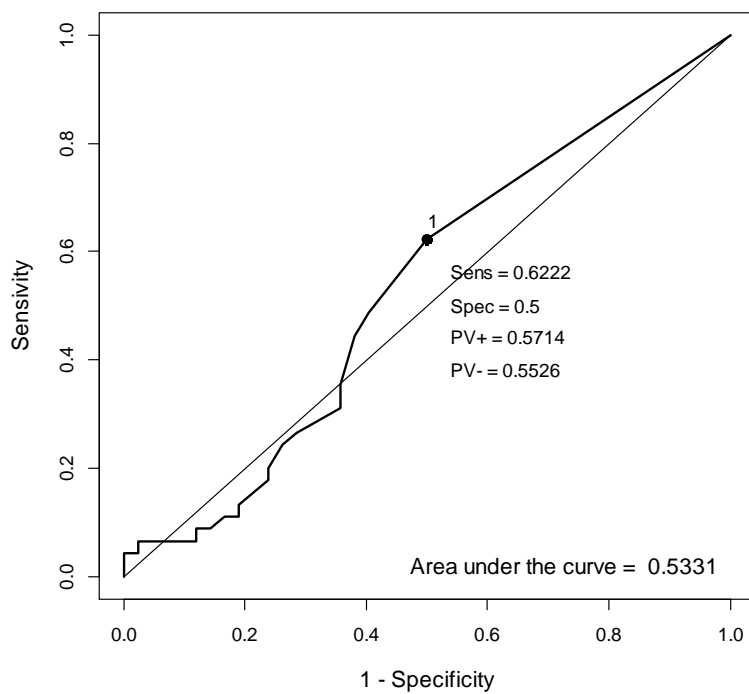
#### III.1. Curvas ROC según valores basales



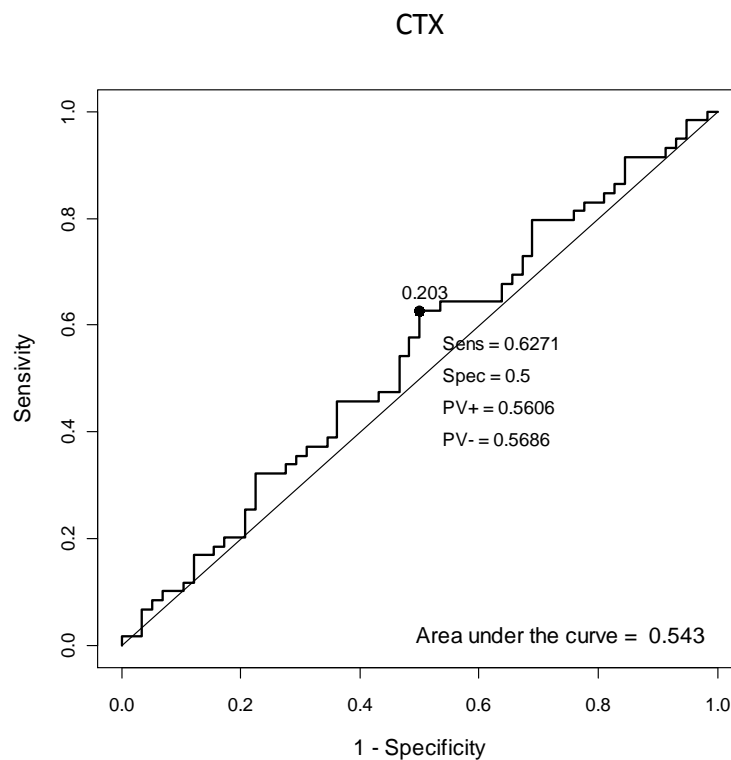
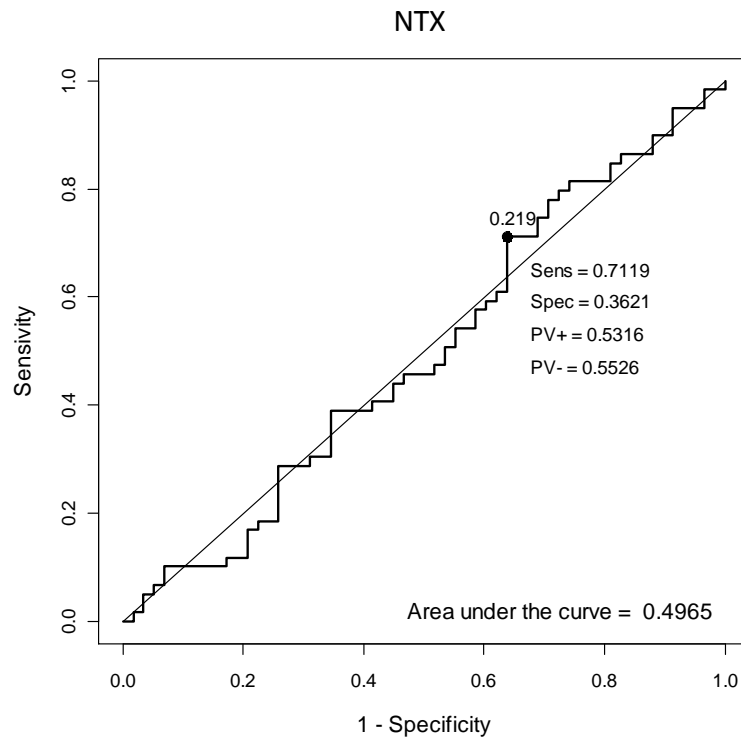
FAO

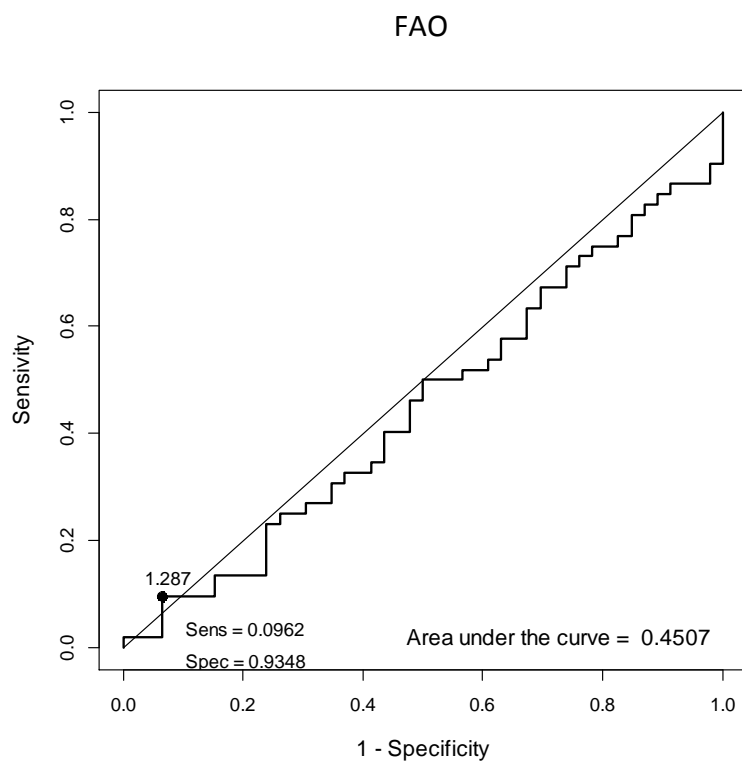


CTC



### III.2. Curvas ROC para cambios en visita 1 respecto a situación basal











## **I. Publicaciones relacionadas con esta tesis:**

1. Mir-326 associates with biochemical markers of bone turnover in lung cancer bone metastasis
2. Usefulness of bone turnover markers as predictors of mortality risk, disease progression and skeletal-related events appearance in patients with prostate cancer with bone metastases following treatment with zoledronic acid: TUGAMO study.
3. Bone turnover markers as predictive indicators of outcome in patients with breast cancer and bone metastases treated with bisphosphonates: results from a 2-year multicentre observational study (ZOMAR study).
4. Circulating tumor cells predicts overall survival in breast cancer patients with bone metastases.



## II. Otros artículos publicados durante la realización de esta tesis:

- 1      **Martín-Fernández M**, Martínez E, Díaz-Curiel M, Guede D, Caeiro JR, De la Piedra C. Effects of PTH (1-84) on bone quality in a validated model of osteoporosis due to androgenic deprivation. Aging male Published Online First: 5 August 2013.
  
- 2      Montero M, Díaz-Curiel M, Guede D, Caeiro JR, **Martín-Fernández M**, Rubert M, Navarro D, de la Piedra C. Effects of kalsis, a dietary supplement, on bone metabolism in the ovariectomized rats. J Osteoporos 2012;2012:639427.

